UNTERSUCHUNGEN ÜBER REDOX-POTENTIALE EINIGER CYSTEINPEPTIDE

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hans-Joachim Julius

aus Borna

1965

Druck:
ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e.V.
DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE
1 Berlin 33, Garystr. 45

UNTERSUCHUNGEN ÜBER REDOX-POTENTIALE EINIGER CYSTEINPEPTIDE

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hans-Joachim Julius

aus Borna

Berichterstatter: Professor Dr. W. Broser
Professor Dr. G. Manecke

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Februar 1965
Tag der Promotion: 31. Juli 1965

Inhaltsübersicht

	Seite
A. Einleitung	5
B. Problemstellung	8
C. Ausführung	1o
1. Synthese des 6-(S.N-Dityrityl-L-cysteinyl-L-tyrosylglycylglycyl-L-tyrosyl-S-trityl-L-cysteinylglycylglycylamido)-1.1'-diäthyl-isocyaninjodids	1o
2. Detritylierung und Oxydation zum cyclischen Disulfid	14
3. Die Redox-Potentiale	22
α. Theoretische Grundlagen	22
ß. Messung der Redox-Potentiale	26
γ. Meßergebnisse	33
D. Diskussion	44
E. Zusammenfassung	51
F. Präparative Vorschriften	52
G. Anhang	6o
H. Literaturverzeichnis	64

A. Einleitung

Die Verknüpfung der S-Bestandteile des Eiweißes mit dem oxydativen Stoffwechsel ist eine so vielseitige, daß die biologische Wertigkeit der Eiweißkörper sehr von dem S-Gehalt abhängt. Um die Spezifität in der Wirkungsweise von Proteinen und nahestehenden Wirkstoffen zu erforschen, wird als wichtiger Gesichtspunkt das Sulfhydryl-Disulfid-System herangezogen. Der Gehalt des in Eiweißstoffen vorkommenden Schwefels ist hauptsächlich auf die Anwesenheit von Cystein bzw. Cystin zurückzuführen. Im Thiol-Disulfid-Gleichgewicht ist ein bemerkenswertes Redox-System gegeben, weil in vivo die Disulfidbindung sich zu freien Thiolen hydrieren läßt und diese reversibel reoxydierbar sind. Thiol-Disulfid-Systeme bestimmen die Aktivität biochemischer Wirkstoffe und beeinflussen Stoffwechselsysteme durch die Lage ihrer Redox-Potentiale.

Die ersten Untersuchungen über das Vorkommen von Sulfhydrylgruppen in tierischen Organen und Geweben gehen auf A. Heffter (1) zurück. Er stellte fest, daß frische Gewebsschnitte reduzierende Eigenschaften haben, die durch Luftoxydation oder Behandeln mit Oxydationsmitteln verloren gehen, bei anschließender Reduktion aber wieder auftauchen und mit denen der positive Nachweis von SH-Gruppen mit Natriumnitroprussid Hand in Hand gehen. Glutathion (γ-L-Glutamyl-L-cysteinylglycin) ist das wichtigste und verbreitetste wasserlösliche Thiol-Disulfid-System im Tier- und Pflanzenreich. Man führt das Reduktionsvermögen von Geweben und Körperflüssigkeiten zu einem beachtlichen Teil darauf zurück; es ist an Redox-Vorgängen und hydrolytischen Prozessen des Stoffwechsels beteiligt. Molekularer Sauerstoff kann das SH-Glutathion - auch in der Zelle - dehydrieren; man hat daher versucht,

Glutathion in biochemische Oxydationsprozesse als Wasserstoffüberträger mit Sauerstoff als Acceptor einzuschalten. F.G. Hopkins und L. Elliott (2) fanden, daß eine intracelluläre enzymatische Reduktion von SS-Glutathion in der tierischen Leber durch ein Dehydrasesystem eintritt. Die SH-Form des Glutathion, die im Blut vorherrscht, scheint also auf Grund von H-Donatoren des Kohlenhydratabbaus zu existieren. Das SH-Glutathion der Hefe vermag das für die Zellatmung so wichtige Cytochrom c zu reduzieren (3), außerdem setzt es sich mit Disulfidgruppen von Eiweißstoffen um und hydriert diese (4).

W. Grassmann (5) entdeckte, daß die pflanzliche Proteinase Papain durch Thiole aktiviert werden kann.
Th. Bersin (6) vertrat die Ansicht, daß im Papain ein Fermentprotein mit den Eigenschaften eines Redoxsystems vorliegt und daß das aktive Enzym Thiolnatur besitzt. Die Aktivität des Enzyms wird von dem Gleichgewicht:

$$2\ PaSH\ (aktiv) = Pa\text{-}S\text{-}S\text{-}Pa\ (inaktiv) + H_2$$

gesteuert. Das Enzym läßt sich reversibel mit O_2, H_2O_2, J_2, $KBrO_3$ inaktivieren und mit Thiolen (SH-Glutathion, Cystein, Thioglykolsäure u.a.) reaktivieren, ein Vorgang, der generell im Mercaptan-Disulfid-Gleichgewicht möglich und bekannt ist. Ascorbinsäure reaktiviert oxydiertes Enzym nicht, da sie Disulfidbindungen nicht zu reduzieren vermag. Eine Inaktivierung des SH-Enzyms mit Jodessigsäure oder Jodacetamid ist irreversibel, weil sie durch Blockierung der SH-Gruppen nach der Gleichung:

$$R\text{-}SH + J\text{-}CH_2\text{-}COOH = R\text{-}S\text{-}CH_2\text{-}COOH + HJ$$

das Redox-Gleichgewicht zerstören. Diese Ergebnisse beweisen, daß die Fermentwirkung von intakten SH-Gruppen im Ferment abhängt.

Aehnliche Untersuchungen mit dem gleichen Ergebnis sind an vielen anderen Beispielen demonstriert worden, so zum Beispiel am Kathepsin (7), dem tierischen Pendant des Papain, an der Urease (8), am Lysozym (9), an der Glycerinaldehyddehydrase (10), der Arginase und Phosphatase (11) und an der Succinodehydrase (12), die im Muskel die Dehydrierung der Bernsteinsäure zur Fumarsäure bewirkt und in der reduzierten Form als Thiolprotein ihren Wasserstoff über die Cytochrome abgibt.

Die angeführte Reihe der Beispiele, die sich übrigens noch weiter fortsetzen ließe, möge die Bedeutung des Thiol-Disulfid-Systems aufzeigen, die es in der Biochemie hat. Die Frage nach der Reaktionsfähigkeit eines thiolhaltigen Enzyms ist eine Frage nach dem Redoxpotential des Mercaptan-Disulfid-Systems. Eine sichere Kenntnis der Potentialverhältnisse wird dazu beitragen, bisher noch nicht geklärte Erscheinungen der Enzymreaktionen verständlicher zu machen. Aber an dieser Stelle soll noch eine andere Frage aufgeworfen werden.

T. Bersin (13) fand, daß viele anorganische und organische Mercaptoverbindungen (NaSH, verschiedene Thiocarbonsäuren, Cystein) durch Ultraviolett-Bestrahlung mit einer Quecksilberdampflampe oxydiert werden. Die Menge des entstandenen Wasserstoffs entsprach der gebildeten Disulfidmenge. Umgekehrt entstehen bei der Bestrahlung von Disulfidcarbonsäuren in wässriger Lösung Thiole und H_2S (14). B. Jacobsson und B. Högberg (15) stellten fest, daß das Redoxpotential des Bieres sich bei Sonnenbestrahlung verschiebt und H_2S gebildet wird. Der wirksame Frequenzbereich erstreckt sich von 420 - 520 nm. Die Addition von Mercaptanen an Styrol oder die Copolymerisation von Styrol und Butadien wird durch Disulfide unter Belichtung stark beschleunigt, nicht aber bei Dunkelheit (16). E. Spode und E. Weber (17) bestrahlten Lösungen von Natriumtellurit

und Cystein mit Licht einer Quecksilberdampflampe unter Verwendung von Interferenz- und Flüssigkeitsfiltern, wobei das Natriumtellurit reduziert wurde. Das Maximum der Reduktion lag bei 313 nm.

In neuerer Zeit werden organische Thiolverbindungen oder Disulfide in der Strahlenchemie als Strahlenschutzmittel gegen ionisierende Strahlen verwendet (18). Ebenso finden diese Verbindungen Verwendung als sensibilisierende Stoffe in der Gelatineschicht der photographischen Platte (19).

An dieser kurzen Auswahl einiger Tatsachen erkennt man die Wichtigkeit der Frage nach der Abhängigkeit des Redox-Potentials von Mercaptan-Disulfid-Systemen von der Lichteinwirkung, die noch geklärt werden muß.

B. Problemstellung

In dieser Arbeit sollen die Redox-Potentiale einer Reihe neu dargestellter Cystein-Peptide gemessen und verglichen werden. Dabei ist zu prüfen, ob die Lage der Potentiale von der Peptidkettenlänge oder von der Bildung von cyclischen Disulfiden abhängt. Außerdem soll die Einwirkung von Lichtenergie, welche möglichst in das Molekül selbst eingestrahlt werden soll, und ihre Auswirkung auf das Redox-Potential geprüft werden. Die von D. Günther (2o) mit N-carbobenzoxy- und S-benzyl- geschützten Aminosäuren aufgebaute Sequenz Cys-tyr-gly-gly-tyr-cys erschien als geeignet, um an den Zwischenstufen die Oxydation zu den offenen Disulfiden und am Hexapeptid die Oxydation zum cyclischen Disulfid zu verfolgen.

Geht man von der Voraussetzung aus, daß bei Energieeinwirkung auf ein Mercaptan die Primärreaktion die homolytische Lösung eines Wasserstoffradikals und Bildung eines Sulfenylradikals (siehe Seite 49) ist, und man nimmt für diese Reaktion einen Energieverbrauch von 81,1 kcal pro Mol (21) an, so müßte energetisch gesehen Licht der Wellenlänge 351,5 nm oder kleiner eine derartige Homolyse bewirken+. Bei geringeren Lichtenergien (größeren Wellenlängen) könnte allenfalls die Voraussetzung für eine derartige Homolyse begünstigt werden. Um einesteils im meßtechnisch besser zugänglichen sichtbaren Bereich zu bleiben (Verwendung von Glasgefäßen), andererseits aber eine direkte Lichteinwirkung zu erhalten, wurde als lichtabsorbierende Komponente 6-Amino-1.1'-diäthylisocyaninjodid verwendet. Ueber die 6-Aminogruppe kann dieser Farbstoff arylamidartig mit Peptiden verbunden werden. Zwischen Hexapeptid und Farbstoffkomponente wurden noch zwei Glycineinheiten zwischengeschaltet. Eine Energiefortleitung über α-Aminosäurepeptide ist gewährleistet, wie aus einer Reihe von Arbeiten (22) hervorgeht. Es wurde also eine Verbindung des Typs Cys-tyr-gly-gly-tyr-cys-gly-gly-NH-isocyaninjodid (XIX) aufgebaut und an ihr das Redox-Potential im Dunkeln und bei Belichtung gemessen und an den Zwischenprodukten die Abhängigkeit des Redox-Potentials von der Kettenlänge untersucht.

+ Der Wert von 81,1 kcal wurde aus der vollständigen Dissoziation des H_2S-Moleküls berechnet. Er ist für Mercaptane nicht streng gültig, da hier eine R-S-H-Bindung vorliegt. Der Unterschied beider Werte dürfte nicht allzu groß sein, so daß obiger Wert von 81,1 kcal/Mol eine Verwendung gerechtfertigt.

C. Ausführung

1. Synthese des 6-(S.N-Ditrityl-L-cysteinyl-L-tyrosylglycylglycyl-L-tyrosyl-S-trityl-L-cysteinylglycylglycylamido)-1.1'-diäthylisocyaninjodids (XVIII)

Bei der Synthese des geschützten Octapeptid-Farbstoffes (XVIII) wurde von der Ueberlegung ausgegangen, daß die Schutzgruppen eine leichte Abspaltung gestatten müssen, ohne daß die Farbstoffkomponente einer reduktiven Veränderung unterliegt. D. Günther (2o) hatte zur Synthese der Aminosäuresequenz Cys-tyr-gly-gly-tyr-cys die N-Carbobenzoxy- und die S-Benzylschutzgruppe verwendet. Diese Schutzgruppen wurden mit Natrium in flüssigem Ammoniak abgespalten. Sie könnten auch abhydriert werden. Um die Wirkung dieser Reaktionen auf die Farbstoffkomponente zu beobachten, wurde das weiter unten erwähnte 6-(Carbobenzoxyglycylamido)-1.1'-diäthylisocyaninjodid (XVI) mit Natrium in flüssigem Ammoniak behandelt. Der Versuch wurde erschwert durch die zu geringe Löslichkeit der Verbindung in flüssigem Ammoniak. Das Reaktionsprodukt, welches sich nach langer Einwirkungsdauer isolieren ließ, war stark mit Nebenprodukten verunreinigt, was sich anhand der viel zu kleinen Extinktion beim Absorptionsmaximum (574 nm) ersehen ließ. Es ließ sich nicht reinigen, selbst Säulenchromatographie versagte. Der Versuch der Hydrogenolyse am Pd-$BaSO_4$-Katalysator lieferte noch schlechtere Ausbeuten. Deshalb konnte die Synthese nicht über das nach D. Günther (2o) bekannte N-Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl-L-tyrosylglycylglycyl-L-tyrosyl-S-benzyl-L-cystein vorgenommen werden.

Als ideale Schutzgruppe bot sich der Tritylrest an. Er ist sowohl zum Schutze der Amino- als auch der Mercaptogruppe geeignet, und seine leichte Abspaltbarkeit mit HCl/Methanol nach L. Cervas und D.M. Theodoropoulos (23) erfüllt alle geforderten Bedingungen. Die Synthese wurde deshalb mit den tritylgeschützten Aminosäuren durchgeführt. Die Ausgangsstufe war das von G. Amiard (24) dargestellte S.N-Ditrityl-L-cystein (Diäthylaminsalz) (I), welches nach einer modifizierten Vorschrift von L. Velluz (25) mit L-Tyrosinäthylesterhydrochlorid nach der Carbodiimidmethode zu S.N-Ditrityl-L-cysteinyl-L-tyrosinäthylester (II) gekuppelt wurde. Beim Umkristallisieren aus Essigester entstand ein Hydrat, das bei 124° schmolz, beim weiteren Erhitzen wieder fest wurde und erneut bei 179 - 180° schmolz. Aus absolutem Alkohol kristallisierte die wasserfreie Verbindung mit einem Schmelzpunkt von 183°. Die Esterverseifung, die von L. Velluz (25) "wie üblich" durchgeführt wurde, erwies sich als recht schwierig. Nach dem zweistündigen Verseifen mit einem 10%-igen Ueberschuß an KOH in Alkohol-Wasser (9 : 1) - wobei zur Neutralisation der phenolischen Hydroxylgruppe des Tyrosins ebenfalls ein äquimolarer Anteil KOH zugegeben wurde - konnte stets nur der Ester in 73 - 78%-iger Ausbeute isoliert werden. Erst die Verseifung mit 20%-iger KOH in Methanol-Wasser (9 : 1) in der Siedehitze führte zu reinem S.N-Ditrityl-L-cysteinyl-L-tyrosin (III) mit einem Schmelzpunkt von 156°, wohingegen Velluz 146 - 148° angibt. Die Werte der optischen Drehung stimmen mit der Literatur überein.

Als nächste Teilsequenz wurde Glycylglycyl-L-tyrosinäthylester (VIII) synthetisiert. Dazu wurde Glycylglycinäthylester nach L. Cervas und D.M. Theodoropoulos (23) tritylliert (IV), anschließend nach G. Amiard (26) verseift (V), nach R. Schwyzer (27) mit Chloracetonitril in den Cyan-

methylester (VI) übergeführt und nach W. Lautsch und Mitarbeitern (28) mit L-Tyrosinäthylester zum Trityl-glycylglycyl-L-tyrosinäthylester (VII) gekuppelt. Die Detritylierung zum Glycylglycyl-L-tyrosinäthylester (VIII) wurde in HCl-Methanol nach L. Cervas und D.M. Theodoropoulos (23, 28) vorgenommen. Darauf wurde das oben erwähnte S.N-Dityrityl-L-cysteinyl-L-tyrosin (III) mit dem erhaltenem Glycylglycyl-L-tyrosinäthylester (VIII) nach der Carbodiimidmethode zum S.N-Dityrityl-L-cysteinyl-L-tyrosylglycylglycyl-L-tyrosinäthylester (IX) gekuppelt. Die Verseifung zur freien Peptidsäure (X) wurde mit 3,1 Molen KOH in Alkohol-Wasser (9 : 1) pro Mol Peptidester vorgenommen. Dabei wurde pro Mol phenolischer OH-Gruppe des Tyrosins auch je ein Mol KOH zur Neutralisation und außerdem 1o % KOH im Ueberschuß zugegeben. Der schweren Verseifbarkeit von Tyrosinestern wurde dadurch Rechnung getragen, daß nicht nur wie üblich zwei Stunden, sondern 24 Stunden stehen gelassen wurde. Diese Zeit führte zur vollständigen Verseifung des Aethylesters. Das entstandene Pentapeptid S.N-Dityrityl-L-cysteinyl-L-tyrosylglycylglycyl-L-tyrosin (X) wurde nach der Carbodiimidmethode mit S-Trityl-L-cysteinylglycinäthylester (XI) - dargestellt durch Kuppeln von S.N-Dityrityl-L-cystein (Diäthylaminsalz) (I) mit Glycinäthylesterhydrochlorid und partieller N-Detritylierung (24) - zum Heptaester (XII) gekuppelt und anschließend wie oben beschrieben zur freien Heptapeptidsäure S.N-Dityrityl-L-cysteinyl-L-tyrosylglycylglycyl-L-tyrosyl-S-trityl-L-cysteinylglycin (XIII) verseift.

Als nächstes wurde die Synthese vom Isocyaninfarbstoff aus in Angriff genommen. 6-Amino-1.1'-diäthylisocyaninjodid (29) zeigt sehr geringe Löslichkeit. So löst sich z.B. in 1oo ml Dimethylformamid nur ca. 6o mg (o,13 mMol) Farbstoff; in anderen Lösungsmitteln ist die Löslichkeit

noch geringer. Kupplungsversuche mit Carbobenzoxyglycin nach der Carbodiimid-, Phosphorazo- und Isocyanatomethode schlugen aus diesem Grunde fehl. Die Kupplung mit Aethoxyacetylen (3o), welches J.F. Arens (31) erstmalig zur Darstellung von Acylaminosäureaniliden verwendete, erschien aussichtsreich, da hier ebenfalls eine Acylaminosäure mit einer Arylaminogruppe zum Säurearylamid verknüpft werden soll. Obwohl aufgrund der geringen Löslichkeit des Farbstoffs in heterogener Phase gearbeitet werden mußte, zeigte diese Methode eine befriedigende Ausbeute an 6-Carbobenzoxyglycylamido-1.1'-diäthylisocyaninjodid (XVI).

Die mikroanalytische Jodbestimmung der aminosäuresubstituierten Aminoisocyaninfarbstoffe wurde auf folgendem Wege durchgeführt: Aufnehmen einer genau abgewogenen Menge Substanz (1o - 2o mg) in Aethylalkohol, Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure und Verdünnen mit Wasser (2 : 1), anschließende potentiometrische Titration mit n/1oo $AgNO_3$. Ein Alkoholfehler tritt dabei nicht auf, wie Testanalysen mit KJ im gleichen Lösungsmittelgemisch zeigten.

Die Decarbobenzoxylierung zum 6-Glycylamido-1.1'-diäthylisocyaninjodid (XVII) wurde nach der Methode von B. Ben Ishai und A. Berger (32) in absolutem Eisessig mit HBr/Eisessig vorgenommen. Das Produkt wurde anschließend in wässrigem HJ gelöst und mit Ammoniak bei p_H 7 wieder ausgefällt, um das ionogen gebundene J^-, welches zum Teil durch Fremdionen (OH^-, Br^-) substituiert war, wieder quantitativ einzuführen.

Die decarboxylierte Verbindung (XVII) zeigte wiederum einer geringe Löslichkeit, jedoch reichte diese in Dimethylformamid aus, um die Kupplung mit S.N-Dityrityl-L-cysteinyl-L-tyrosylglycylglycyl-L-tyrosyl-S-trityl-L-cysteinylglycin (XIII) zum 6-(S.N-Dityrityl-L-cysteinyl-L-tyrosylglycylglycyl-L-tyrosyl-S-trityl-L-cysteinyl-glycylglycylamido)-1.1'-diäthylisocyaninjodid (XVIII) nach der Carbodiimidmethode durchzuführen. Diese Substanz ist ein in polaren organischen Lösungsmitteln gut lösliches Pulver, welches mit Aether oder Ligroin ausgefällt werden kann.

2. Detritylierung und Oxydation zum cyclischen Disulfid

Die Messung der Redoxpotentiale von Sulfhydrylverbindungen läßt sich am besten durch potentiometrische Titration mit einer Jodlösung (siehe Seite 27) durchführen. Es mußte zunächst festgestellt werden, ob elementares Jod den aromatischen Ring des Tyrosinrestes unter den Versuchsbedingungen jodiert. Dazu wurde Tyrosinäthylester in Chloroform gelöst und bei Zimmertemperatur mit einer Lösung von J_2 in Chloroform behandelt. Selbst nach mehrstündigem Stehen war keine Entfärbung festzustellen, und der Ester konnte in über 90%-iger Ausbeute zurückgewonnen werden, so daß also sicher keine Jodierung eintritt.

King und Lucas (33) stellten fest, daß bei längerem Einwirken von J_2 im Ueberschuß auf Cystein dieses über die Disulfidstufe hinaus zur Cysteinsäure oxydiert wird. Um einer Möglichkeit einer Oxydation zur Sulfonsäure nachzu-

gehen - obwohl sie nicht wahrscheinlich ist, da Jod nicht im Ueberschuß angewendet wird -, wurde S.N-Ditrityl-L-cysteinyl-L-tyrosinäthylester (II) in Alkohol gelöst, mit HCl/absolutem Alkohol durch dreiminutiges Rückflußkochen unter Stickstoff detrityliert und sofort mit n/2o J_2-Lösung in Alkohol oxydiert. Dabei wurde die theoretische Menge Jod verbraucht. Anschließend wurde die Lösung mit Wasser, Pyridin und KJ versetzt und mit alkoholischer HCl p_H 6 eingestellt, ein Lösungsmittelgemisch, in dem später die Redox-Potentiale bestimmt wurden. Nun wurde ein geringer J_2-Ueberschuß dazugegeben, so daß die braune Jodfarbe gerade sichtbar war. Nach eintägigem Stehen unter Luftabschluß war die Jodfarbe noch immer vorhanden, so daß keine Weiteroxydation eingetreten sein kann.

Die Abspaltung der Tritylschutzgruppen an den Cysteinpeptiden erfolgte durch dreiminutiges Rückflußkochen mit einem geringen Ueberschuß an HCl in absolutem Methanol. Dabei mußte unter einer Reinstickstoffatmosphäre gearbeitet werden, um eine anschließende Luftoxydation zum Disulfid zu vermeiden. Während der Detritylierung in methanolischer HCl wurde die freie Carboxylgruppe der Peptidsäuren in den Methylester überführt, wie deutlich aus dem Auftauchen der Esterbande in aufgenommenen Infrarot-Spektren zu ersehen war.

Als nächstes mußte untersucht werden, ob das freie Mercaptan isoliert werden konnte. Eine Mercaptidfällung mit Pb^{++}, Hg^{++} oder Ag^{+} kam nicht in Frage, da durch diese Ionen gleichzeitig das ionogen

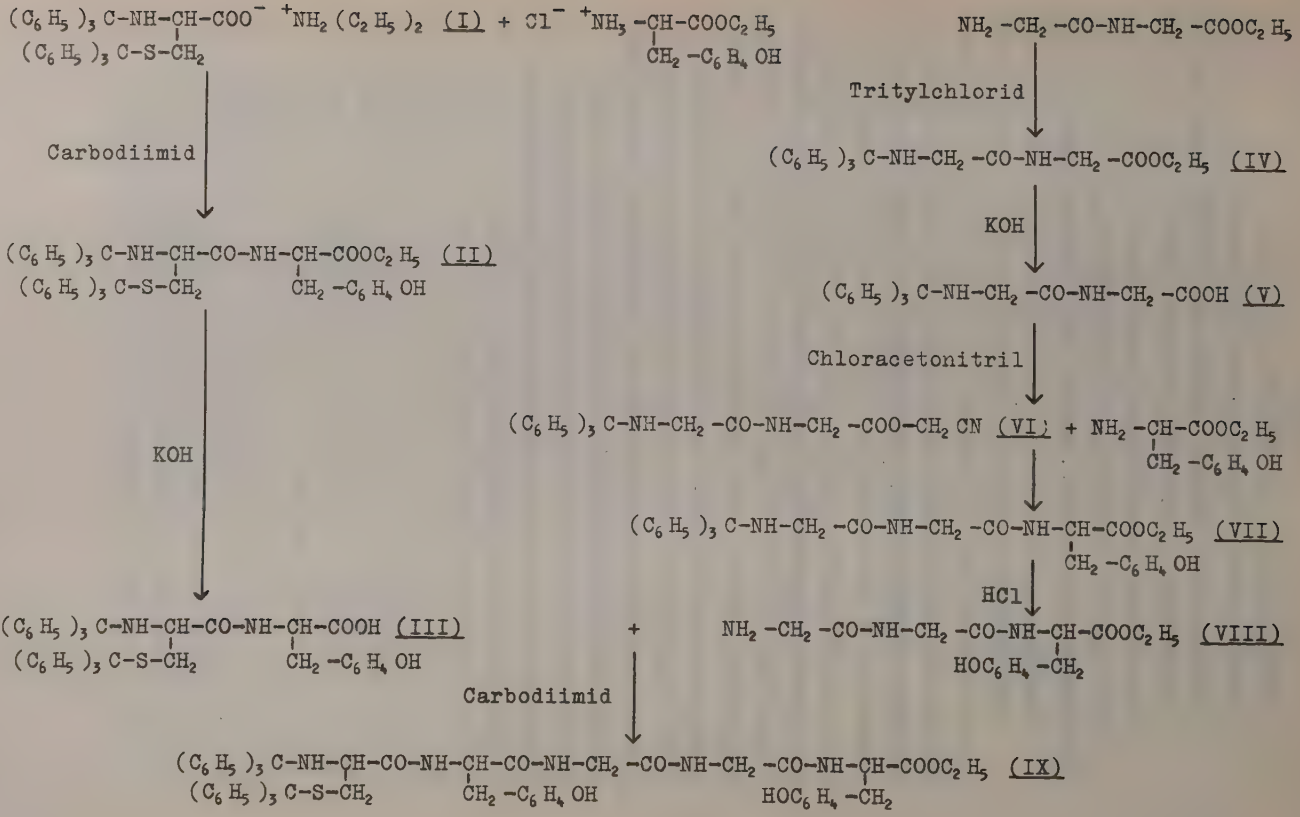
gebundene J^- der Farbstoffkomponente mit ausgefällt werden würde. Cu^{++} oxydiert das Mercaptan zum Disulfid (34), und Cu^+ fällt wieder J^- aus. Am aussichtsreichsten erschienen noch die Erdalkalimetalle und Cd^{++}. Die Löslichkeitsprodukte der entsprechenden Mercaptide waren aber so groß, daß es zu keiner Ausfällung kam. Aus diesem Grunde wurde auf eine Mercaptidfällung verzichtet und das freie Linearpeptid sofort einer Disulfidoxydation unterworfen. Diese Methode war durchaus zu vertreten, da die spätere Redox-Titration mit Jod von Verunreinigungen weitgehend unabhängig ist (siehe Seite 28).

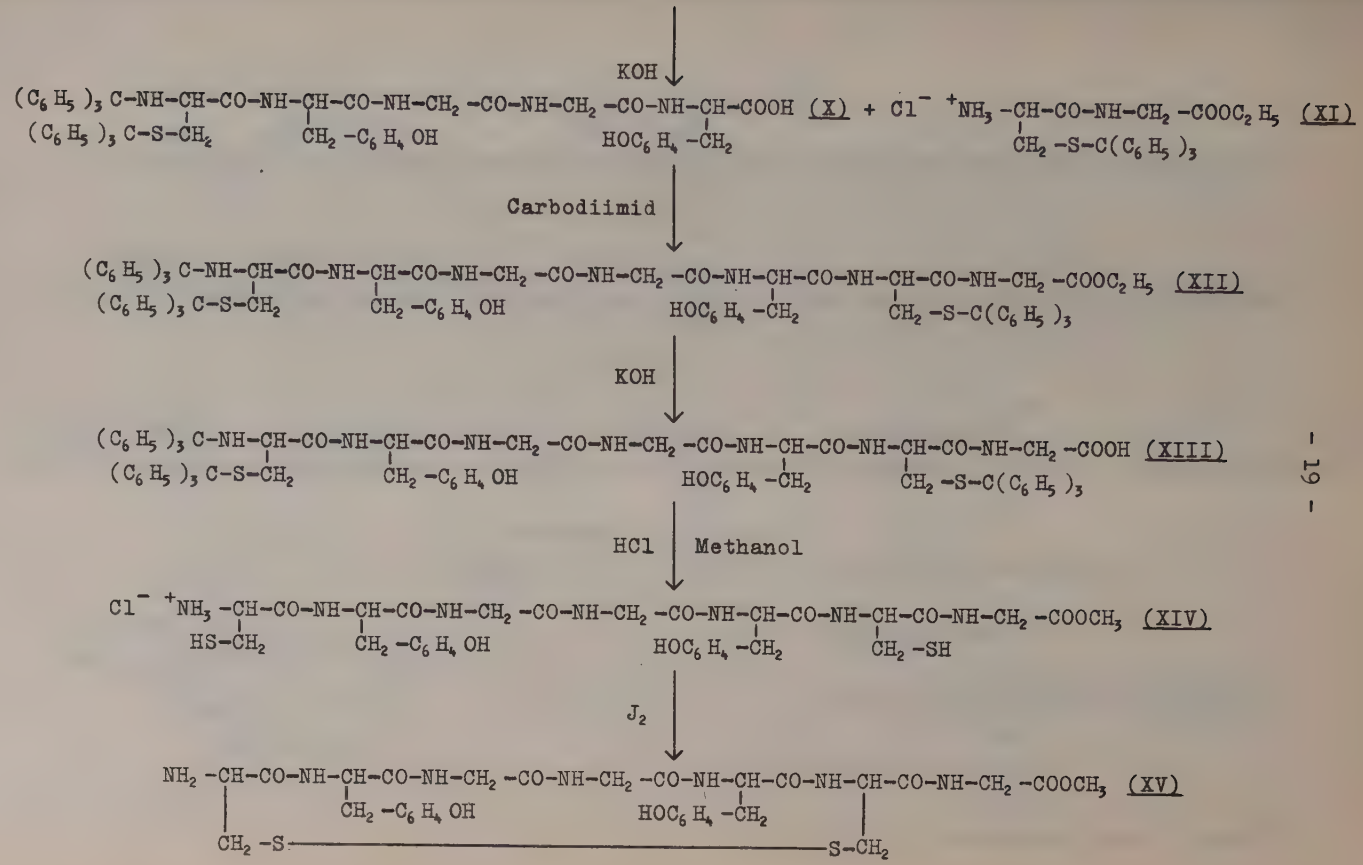
Die Oxydation selbst wurde auf folgendem Wege durchgeführt:

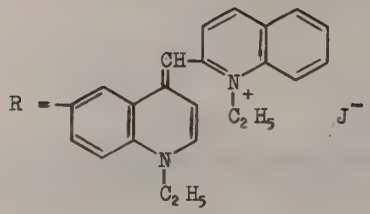
> Ein nach H. Kautsky und Thiel (35) hochgereinigter Stickstoffstrom durchstreicht den 4-Hals-Oxydationskolben, der 150 ml Chloroform enthält. Der Stickstoff wird anschließend über ein Ableitungsrohr durch einen aufgesetzten Kühler in einen Tropftrichter eingeleitet, der sich auf dem mittleren Hals des 4-Halskolbens befindet und in dem sich das tritylgeschützte Peptid in alkoholischer Lösung befindet. Die Gasableitung befindet sich am oberen Ende des Kühlers. Der vierte Hals des Reaktionskolbens war mit einer Kolbenbürette verbunden, in der sich n/20 J_2-Lösung in Chloroform befand. Nachdem die Apparatur unter Reinstickstoff stand, wurde zu dem Peptid in dem Tropftrichter die nötige Menge 1 n HCl in absolutem Alkohol gegeben und, nachdem die eingedrungene Luft wieder

verdrängt war, der Tropftrichter mit einem Mikrobrenner erhitzt. Nach dreiminutigem Rückflußkochen war die Detritylierung beendet. Nun wurde die detritylierte Peptidlösung im gleichen Maße wie die Jodlösung in den Oxydationskolben eingetropft, so daß das Ziegler'sche Verdünnungsprinzip gewährleistet war (vergleiche Abb. 1).

Auf diese Weise wurden die cyclischen Disulfide des Heptapeptides (XV) und des Octapeptidfarbstoffes (XX) hergestellt. Die Disulfide fallen als ein weißes (XV) beziehungsweise violettes (XX) Pulver an und sind in polaren organischen Lösungsmitteln gut und in Wasser etwas löslich. Sie können mit Aether oder mit Ligroin ausgefällt werden. Ihre Reinigung erwies sich als recht schwierig, da sie sehr fest anorganische Salze binden (36). Es wurde daher auf die analysenreine Darstellung der beiden Disulfide verzichtet, da außerdem das Redox-Potential der Mercaptane von der Konzentration der oxydierten Disulfidform unabhängig ist (vergleiche Kapitel 3. α.) und die Disulfide nicht zur Messung der Redox-Potentiale eingesetzt werden mußten.


(C6H5)3C-NH-CH-COO⁻ +NH2(C2H5)2 (I) + Cl⁻ +NH3-CH-COOC2H5
(C6H5)3C-S-CH2 CH2-C6H4OH
NH2-CH2-CO-NH-CH2-COOC2H5
Tritylchlorid
(C6H5)3C-NH-CH2-CO-NH-CH2-COOC2H5 (IV)
Carbodiimid
KOH
(C6H5)3C-NH-CH-CO-NH-CH-COOC2H5 (II)
(C6H5)3C-S-CH2 CH2-C6H4OH
(C6H5)3C-NH-CH2-CO-NH-CH2-COOH (V)
Chloracetonitril
(C6H5)3C-NH-CH2-CO-NH-CH2-COO-CH2CN (VI) + NH2-CH-COOC2H5
CH2-C6H4OH
KOH
(C6H5)3C-NH-CH2-CO-NH-CH2-CO-NH-CH-COOC2H5 (VII)
CH2-C6H4OH
HCl
(C6H5)3C-NH-CH-CO-NH-CH-COOH (III)
(C6H5)3C-S-CH2 CH2-C6H4OH
+
NH2-CH2-CO-NH-CH2-CO-NH-CH-COOC2H5 (VIII)
HOC6H4-CH2
Carbodiimid
(C6H5)3C-NH-CH-CO-NH-CH-CO-NH-CH2-CO-NH-CH2-CO-NH-CH-COOC2H5 (IX)
(C6H5)3C-S-CH2 CH2-C6H4OH HOC6H4-CH2


KOH
(X) + Cl⁻ ⁺NH₃ -CH-CO-NH-CH₂ -COOC₂H₅ (XI)
Carbodiimid
(XII)
KOH
(XIII)
HCl | Methanol
Cl⁻ ⁺NH₃ -CH-CO-NH-CH-CO-NH-CH₂ -CO-NH-CH₂ -CO-NH-CH-CO-NH-CH-CO-NH-CH₂ -COOCH₃ (XIV)
J₂
NH₂ -CH-CO-NH-CH-CO-NH-CH₂ -CO-NH-CH₂ -CO-NH-CH-CO-NH-CH-CO-NH-CH₂ -COOCH₃ (XV)



$C_6H_5-CH_2-O-CO-NH-CH_2-COOH + NH_2-R$

↓ Aethoxyacetylen

$C_6H_5CH_2-O-CO-NH-CH_2-CO-NH-R$ (XVI)

↓ HBr/Eisessig

$NH_2-CH_2-CO-NH-R$ (XVII)

(XIII) + Carbodiimid ↓

$(C_6H_5)_3C-NH-CH(CH_2-C_6H_4OH)-CO-NH-CH(CH_2-S-C(C_6H_5)_3)-CO-NH-CH_2-CO-NH-CH_2-CO-NH-CH(CH_2-C_6H_4OH)-CO-NH-CH(CH_2-S-C(C_6H_5)_3)-CO-NH-CH_2-CO-NH-CH_2-CO-NH-R$ (XVIII)

↓ HCl

$Cl^- {}^+NH_3-CH(CH_2-SH)-CO-NH-CH(CH_2-C_6H_4OH)-CO-NH-CH_2-CO-NH-CH_2-CO-NH-CH(CH_2-C_6H_4OH)-CO-NH-CH(CH_2-SH)-CO-NH-CH_2-CO-NH-CH_2-CO-NH-R$ (XIX)

↓ J_2

$NH_2-CH(CH_2-S-\cdots-S-CH_2)-CO-NH-CH(CH_2-C_6H_4OH)-CO-NH-CH_2-CO-NH-CH_2-CO-NH-CH(CH_2-C_6H_4OH)-CO-NH-CH(CH_2-S-\cdots-S-CH_2)-CO-NH-CH_2-CO-NH-CH_2-CO-NH-R$ (XX)

		F.	α	c	Lm
I	S.N-Ditr-cys-OH·NH(C_2H_5)$_2$ (24)	204	71	2	C
II	S.N-Ditr-cys-tyr-OC_2H_5 (25)	179	71	2	D
III	S.N-Ditr-cys-tyr-OH (25)	156	87,5	2	C
IV	Tr-gly-gly-OC_2H_5 (23)	162			
V	Tr-gly-gly-OH (26)	168			
VI	Tr-gly-gly-O-CH_2CN (27)	157			
VII	Tr-gly-gly-tyr-OC_2H_5 (28)	132	21,5	2	T
VIII	Gly-gly-tyr-OC_2H_5 (23, 28)	168	42	o,5	E
IX	S.N-Ditr-cys-tyr-gly-gly-tyr-OC_2H_5	155	53	1	D
X	S.N-Ditr-cys-tyr-gly-gly-tyr-OH	165	22	1	D
XI	S-Tr-cys-gly-OC_2H_5·HCl·H_2O (24)	100			
XII	S.N-Ditr-cys-tyr-gly-gly-tyr-S-tr-cys-gly-OC_2H_5	173	31	1	D
XIII	S.N-Ditr-cys-tyr-gly-gly-tyr-S-tr-cys-gly-OH	183	23	1	D
XIV	Cys-tyr-gly-gly-tyr-cys-gly-OCH_3·HCl				
XV	Cys-tyr-gly-gly-tyr-cys-gly-OCH_3 (S—S)	184			
XVI	6-(Cbo-gly-NH)-farbst	132			
XVII	6-(Gly-NH)-farbst	196			
XVIII	6-(S.N-Ditr-cys-tyr-gly-gly-tyr-S-tr-cys-gly-gly-NH)-farbst	168			
XIX	6-(Cys-tyr-gly-gly-tyr-cys-gly-gly-NH)-farbst·HCl				
XX	6-(Cys-tyr-gly-gly-tyr-cys-gly-gly-NH)-farbst (S—S)	235			

Tr = Trityl Cbo = Carbobenzoxy

Farbst = 1.1'-Diäthylisocyaninjodid

α = spezifische Drehung c = Konzentration

Lm = Lösungsmittel

C = Chloroform D = Dimethylformamid E = Essigester

T = Tetrahydrofuran

3. Die Redox-Potentiale

α. Theoretische Grundlagen

Jeder Redox-Prozess, sei er nun in der Summengleichung elektroneutraler oder ionogener Art, wird stets von einem Elektronenübergang bestimmt. Dabei bedeutet Reduktion: Elektronenzufuhr; und Oxydation: Elektronenentzug. Daraus ergibt sich, daß eine Reduktion niemals stattfinden kann ohne gleichzeitige Oxydation, denn die dem reduziertem Partner zugeführten Elektronen müssen stets einem anderen System (dem Reduktionsmittel) entzogen worden sein, welches dadurch oxydiert wurde. Die beiden Teilvorgänge sind also miteinander gekoppelt wie Ursache und Wirkung, und der Ausdruck Oxydoreduktion beziehungsweise Redox-Prozess drückt den ursächlichen Zusammenhang wohl am besten aus. Man erkennt schon jetzt, daß das elektrische Potential ein quantitatives Maß für die Triebkraft dieser Reaktionen darstellt.

Sowohl die anorganischen als auch die dem Anschein nach meist elektroneutral verlaufenden organischen Redox-Prozesse zeigen eine EMK. Die insgesamt elektroneutrale Reaktion zerfällt in zwei Teilschritte, nämlich
1. in eine Aufnahme bzw. Abgabe eines Elektrons, und
2. in eine Aufnahme bzw. Abgabe eines Protons, wobei der erste Schritt charakteristische und der zweite Schritt akzessorische Merkmale trägt. Hierbei sei über die Reihenfolge der Teilschritte, die durchaus keinen Einfluß auf die Potentialbildung ausübt, nichts ausgesagt.

Die Mercaptan-Disulfid-Oxydation mittels Jod zeigt in ihrer Formulierung:

$$R\text{-}\underline{S}\text{-}H + |\underline{J}\text{-}\underline{J}| + H\text{-}\underline{S}\text{-}R = R\text{-}\underline{S}\text{-}\underline{S}\text{-}R + 2\ H\text{-}\underline{J}|$$

durchaus obiges Bild.

Die Peters'sche Gleichung lautet in ihrer allgemeinsten Form:

$$^{o}E = \underline{^{o}E'} + \frac{RT}{n_e F} \ln \frac{[Ox]_a}{[Red]_a} + \frac{RT}{n_e F} f([H^+]_a)$$

Die Potentialdifferenzen sind auf die Normalwasserstoffelektrode bezogen, das heißt auf eine Platinelektrode, die von H_2-Gas unter 760 Torr in einer Lösung von p_H=0 umspült wird, da die Potentialdifferenz zum absoluten Nullpotential nicht exakt meßbar ist.

Es bedeutet:[+]

^{o}E = Spannungsdifferenz gegenüber der Normalwasserstoffelektrode = Potential

$\underline{^{o}E'}$ = Normalpotential

n_e = Wertigkeit des Elektrodenprozesses

Subindex a = Aktivitäten der Lösungen

$f([H^+]_a)$ = Abhängigkeit des Potentials vom p_H

Die Peters'sche Gleichung liefert die Potentialdifferenz eines "korrespondierenden Redox-Paares", also eines

---

[+] Die Symbole sind "Hoppe-Seyler-Thierfelder, Physiologisch- und pathologisch-chemische Analyse", Bd. I, S. 690, entnommen.

im Gleichgewicht befindlichen Reduktans-Oxydans-Gemisches gegenüber der Normalwasserstoffelektrode. An ihr können einige Vereinfachungen vorgenommen werden:

1. Man setzt die Aktivitäten gleich den Konzentrationen, ohne die Debye-Hückel-Onsager'sche Theorie zu berücksichtigen.

Dies ist bei Ionenreaktionen, insbesondere bei solchen mit höherwertigen Ionen, nur bedingt zulässig, das heißt nur in einem Gebiet so hoher Verdünnung, daß die Reproduzierbarkeit der potentiometrischen Messung gefährdet ist. Bei elektroneutralen Reaktionen ist das Gebiet der Aktivitäts- und Konzentrations-Gleichheit so stark erweitert, daß die bei den später beschriebenenMessungen angewendeten Konzentrationen gleich den Aktivitäten gesetzt werden können.

2. Der Summand $\frac{RT}{n_e F} f\left(\left[H^+\right]_a\right)$ kann in das Normalpotential $\underline{^\circ E'}$ einbezogen werden, wenn der p_H-Wert konstant ist. Das Normalpotential $\underline{^\circ E}$ und das Potential $^\circ E$ gelten dann nur für diesen bestimmten konstanten p_H-Wert.

Diese Vereinfachung konnte vorgenommen werden, da das zur Messung verwendete Lösungsmittelgemisch Wasser, Alkohol, Pyridin, alkoholische HCl eine ausreichende Pufferwirkung besitzt.

Die Peters'sche Gleichung nimmt damit die Form:

$$^\circ E = \underline{^\circ E} + \frac{RT}{n_e F} \ln \frac{[Ox]}{[Red]}$$

beziehungsweise durch Vertauschen von Zähler und Nenner des Logarithmus:

$$^\circ E = \underline{^\circ E} - \frac{RT}{n_e F} \ln \frac{[Red]}{[Ox]}$$

bei konstantem p_H an.

Eine wichtige Voraussetzung ist die, daß Reduktans und Oxydans miteinander im Gleichgewicht stehen müssen, eine Voraussetzung, die beim Mercaptan-Disulfid-System nicht unbedingt gegeben ist. Verschiedene Autoren (37, 38, 39, 41) stellten fest, daß das Potential von Mercaptan-Disulfid-Gemischen von der Disulfid-Konzentration unabhängig ist. Andererseits wurde bei der Oxydation von Mercaptanen ein Potentialgang beobachtet, der durchaus der Theorie der Peters'schen Gleichung folgt (34, 38, 4o, 41). Das Potential stellt sich aber nur aufgrund der Mercaptankonzentration ein. M. Dixon und J.H. Quastel (38) zeigten, daß das Potential im Cystein-Cystin-System der Gleichung

$$E = \frac{RT}{2F}\ln k + \frac{RT}{F}\ln\left[H^+\right] - \frac{RT}{F}\ln\frac{\left[R\text{-}S\text{-}H\right]}{\sqrt{\left[R\text{-}S\text{-}S\text{-}R\right]}}$$

folgt, wenn $\left[R\text{-}S\text{-}S\text{-}R\right]$ als konstant angenommen wird. Es kann dann nicht die Konzentration an Cystin bedeuten, sondern es bedeutet ein reversibel gebildetes Zwischenprodukt (evtl. das Sulfenylradikal?), welches irreversibel in Cystin übergeht und daher stets in bestimmter konstanter Sättigungskonzentration vorliegt. Andere Autoren (37, 4o, 41, 42) schlossen sich dieser Ansicht an. Ebenso wurde von E.S.G. Barron (43) und Mitarbeitern durch Messungen an einer Quecksilberkathode obiges Bild bestätigt. Allerdings konnte hier sogar das Zwischenprodukt in Form von Quecksilbercysteinat gefunden werden. Sie stellten die der Reaktionsgleichung

$$2\ RSH + Hg = (RS)_2Hg + 2\ H^+ + 2\ e$$

zugrunde liegende Formel

$$E = E_0 - \frac{RT}{F}\ln\frac{\left[RSH\right]}{\sqrt{\left[(RS)_2Hg\right]}} + \frac{RT}{F}\ln\left[H^+\right]$$

auf, wobei $[(RS)_2Hg]$ als konstant angenommen wurde.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß das Mercaptan-Disulfid-System ein semireversibles Redox-System ist, dessen Potentialeinstellung in Richtung auf das Oxydans der Gleichung

$$^{o}E = \underline{^{o}E} - \frac{RT}{F} \ln [R\text{-}S\text{-}H]$$

oder, wenn man den natürlichen Logarithmus in den dekadischen umrechnet und die Werte der Konstanten R, T und F einsetzt

$$^{o}E = \underline{^{o}E} - 0{,}059 \lg [R\text{-}S\text{-}H]$$

bei konstantem p_H und 25°C folgen sollte.

ß. Messung der Redox-Potentiale

Zur Bestimmung von Redox-Potentialen stehen drei grundlegende Methoden zur Verfügung, die entsprechend variiert werden können:

1. Das colorimetrische Verfahren.
Die Messung erfolgt mit Hilfe von Redox-Indikatoren. Dieses Verfahren hat den Nachteil großer Ungenauigkeit.

2. Das polarographische Verfahren.
Die oxydierte Form des Redox-Systems wird an der Quecksilbertropfelektrode reduziert. Der Nachteil dieses Verfahrens liegt darin, daß bei irreversiblen Reaktionen (in diesem Falle Reduktion des Disulfids) die sogenannten "Halbwellenpotentiale" wesentlich negativer liegen als die von J.B. Conant (44) definierten "Scheinbaren Reduktionspotentiale". Außerdem sind die reinen Disul-

fide der Cysteinpeptide experimentell schwer zugänglich (siehe Seite 17), so daß für die Messung besser die leichter zugänglichen freien Cysteinpeptide in der Mercaptanform nach der dritten Methode Verwendung finden sollten.

3.Das elektrometrische Verfahren.

Es vereint den Vorteil großer Genauigkeit mit dem des geringen Zeitaufwandes. Man mißt das von einem Redox-System einer Edelmetallelektrode aufgeprägte Potential gegen eine Bezugselektrode. Es gibt zwei experimentelle Möglichkeiten:

a. Potentialeinstellung nach Mischung stetig ansteigender Konzentrationen an Oxydans und abfallender Konzentrationen an Reduktans beziehungsweise umgekehrt. Diese Methode ist für das System Mercaptan-Disulfid ungeeignet, da das Potential unabhängig von der Disulfidkonzentration ist (siehe Seite 25).

b. Man geht von reinem Reduktans (oder Oxydans) aus und oxydiert (reduziert) mit einem stärkeren Oxydationsmittel (Reduktionsmittel). Ausgehend vom Mercaptan ist diese Methode sehr gut geeignet, da die Reaktion in dieser Richtung durchaus reversibel (semireversibel) erscheint. Voraussetzung ist, daß das Redox-Potential des Oxydationsmittels wesentlich positiver liegt als das des Mercaptans, so daß bei Zugabe des Oxydationsmittels das Gebiet größter Beschwerung (gleiches Verhältnis von Reduktans zu Oxydans) des Mercaptan-Disulfid-Systems durchlaufen wird im Gebiet geringer Beschwerung des Oxydationsmittels.

Als geeignetes Oxydationsmittel erwies sich elementares Jod (34). Das Normalpotential des Elektrodenprozesses

$$2J^- = J_2 + 2e$$

beträgt +o,62 V, das des Cystein-Cystin-Systems liegt mindestens o,4 V tiefer. (Für Cystein-Cystin sind von

verschiedenen Autoren sehr unterschiedliche Werte angegeben worden, so zum Beispiel +o,13 V von J.W. Williams u. Mitarb. (4o), +o,o73 V von J.M. Kolthoff u. Mitarb. (45), -o,23 V von J.S. Fruton u. Mitarb. (46), -o,329 V von J.C. Gosh u. Mitarb. (39) und -o,39 V von H. Borsook u. Mitarb. (47))

Die Oxydation mit elementarem Jod ist ebenfalls vorteilhaft im Hinblick auf die Reaktion mit dem Octapeptid-Farbstoff (XIX), da die reduktiv gebildeten Jodidionen einem Anionenaustausch des Farbstoffjodids gegen Fremdionen entgegenwirken. Außerdem hat diese Methode noch den großen Vorteil, daß sie sowohl von Verunreinigungen der Cysteinpeptide - wenn diese nicht gerade reduzierend oder oxydierend wirken - als auch vom Titer der Jodlösung unabhängig ist, da das Normalpotential gleich dem Ordinatenwert des Wendepunktes der Titrationskurve ist. Der Wendepunkt hat unabhängig von der Mercaptan-Anfangskonzentration und vom Titer der Jodlösung stets denselben Ordinatenwert, da die Titrationskurve im Wendepunkt ein Symmetrieelement hat.

Zur Durchführung der Messungen wurde das Verdrängungsverfahren gewählt, das heißt der störende Luftsauerstoff wurde durch hochgereinigten Stickstoff aus der Apparatur verdrängt.

Die Meßanordnung zeigt Abbildung 1. Bomben-Reinstickstoff wird nach Kautsky und Thiele (35) durch eine Säule mit alkalischer $Na_2S_2O_4$-Lösung und anschließend durch Waschflaschen mit alkalischer Pyrogallollösung, halbkonzentrierter H_2SO_4 und Watte geleitet. Der Stickstoff soll weniger als o,oo5 % Sauerstoff enthalten. Um eine Diffusion des Luftsauerstoffes durch Gummischläuche zu vermeiden, dürfen nur Glasrohrleitungen verwendet werden,

die Glas auf Glas durch kurze paraffinierte Schlauchstücke miteinander verbunden sind.

Einen Test auf Sauerstoffreiheit gibt H. v. Wartenberg (48) an:
Das Gasableitungsrohr der Apparatur wird mit einem Gefäß verbunden, das nur Gaszuleitung und -ableitung enthält und in dem sich ein frisch geschnittenes Stück gelben Phosphors befindet. Nach Verdrängen der Luft durch Stickstoff muß die Nebelbildung alsbald verschwinden. Sie setzt bei o,oo2 % schwach ein und ist bei o,oo5 % deutlich sichtbar.

Der gereinigte Stickstoff gelangt bei a (Abbildung 1 auf Seite 31) in die Meßapparatur. Es empfiehlt sich, vorher noch eine Ueberdrucksicherung (5o cm) und einen Blasenzähler vorzuschalten. Der Stickstoff durchstreicht das Meßgefäß b (Fa. Deutsche Metrohm KG. Essen), welches fünf Schliffe enthält und durch einen Thermostatmantel mit Hilfe eines Thermostaten auf 25°C gehalten wird. Das Magnetrührwerk c sorgt für kräftiges Durchmischen der Lösung. Der Stickstoff verläßt durch den Waschflaschenaufsatz bei a wieder das Meßgefäß b und wird, nachdem er bei d über eine Fritte mit halbkonzentrierter Schwefelsäure pyridinfrei gewaschen wurde, durch den Rückflußkühler bis in den Tropftrichter e geleitet. Er entweicht am seitlichen Ansatz des Rückflußkühlers.

Die restlichen drei Schliffe des Meßgefäßes b sind mit der Kolbenbürette f, die n/5o J_2-Lösung in absolutem Alkohol enthält, mit der kombinierten Glaselektrode g und mit der kombinierten Platinelektrode h verbunden. Die Elektroden können wahlweise an das Meßgerät i angeschlossen werden. (Elektroden und Meßgerät Titriskop E 366 Fa. Deutsche Metrohm KG. Essen.)

Vor Beginn der Messung wird das Meßgerät i mit Hilfe einer Pufferlösung vom p_H 6 und der kombinierten Glaselektrode g geeicht. Danach wird die Glaselektrode g auf das Meßgefäß b, in dem sich eine Mischung von 5o ml Pyridin, 2o ml Wasser und 7oo mg KJ befindet, aufgesetzt und der Stickstoffstrom angestellt. Platinelektrode h und Kolbenbürettenspitze befinden sich ebenfalls in den betreffenden Schliffen des Meßgefäßes b.

Nun werden in den Tropftrichter e jeweils o,2 mMol tritylgeschütztes Peptid (I, II, III, IX, X, jedoch von den Dimercaptanpeptiden XII, XIII, und XVIII nur o,1 mMol) beziehungsweise zu Vergleichszwecken auch Cystein, Thiophenol und n-Butylmercaptan eingewogen und mit 3 ml 1 n-HCl in absolutem Methanol übergossen. Nachdem die Luft vollständig aus der Apparatur durch Stickstoff verdrängt wurde (ca. 1 Std.), wird das Methanol im Tropftrichter e mit einem Mikrobrenner zum Sieden erhitzt. Nach dreiminutigem Rückflußkochen ist die Detritylierung beendet. Nachdem sich die Peptidlösung abgekühlt hat, tropft man sie in das Meßgefäß b ein. Der Tropftrichter e wird wieder mit 1 n HCl/Alkohol gefüllt und die kombinierte Glaselektrode g mit dem p_H-geeichten Meßgerät i verbunden. Anschließend wird so lange 1 n HCl/Alkohol aus dem Tropftrichter e in das Meßgefäß b getropft, bis p_H 6 beziehungsweise in einer zweiten Meßreihe p_H 5 erreicht ist. (Um den p_H 5 zu erreichen, verwendet man zweckmäßigerweise 3 n HCl/Alkohol.)

Das Meßgerät i wird nun in die Nullstellung (mV) gebracht und die kombinierte Platinelektrode h angeschlossen. Man drückt dann in Portionen von jeweils o,2 ml die n/5o J_2-Lösung aus der Kolbenbürette f in das Meßgefäß b ein und liest die angezeigte Potentialdifferenz der kombinierten Platinelektrode h ab.

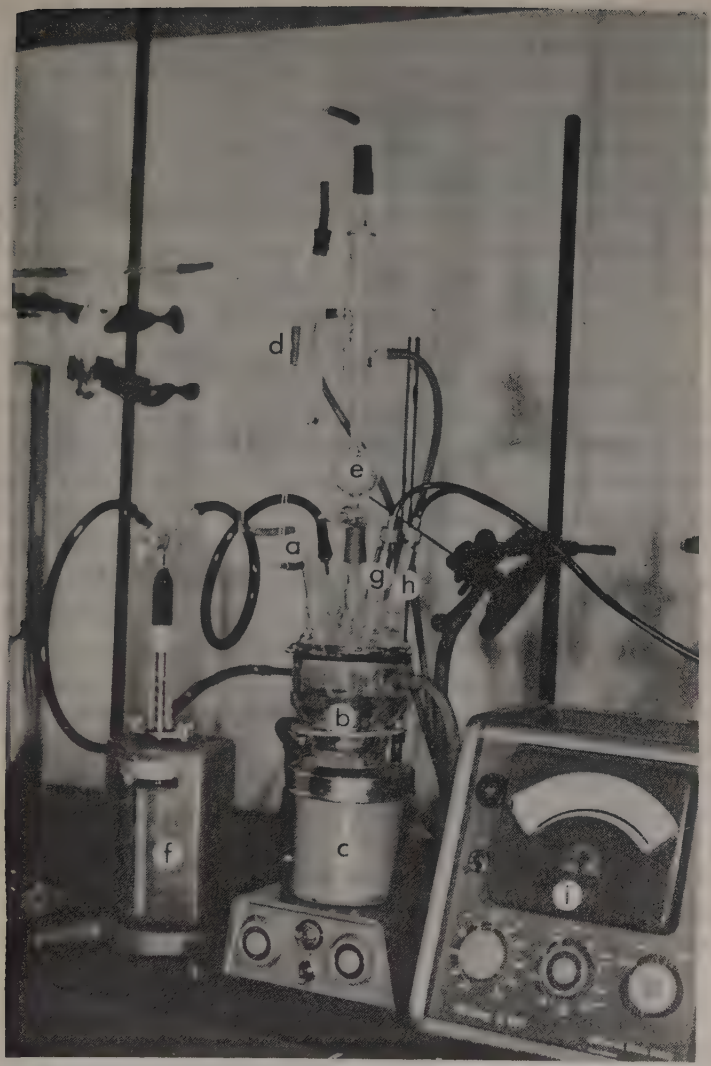


Abbildung 1

Die Potentialeinstellung erfolgt bei Cystein und bei den Dipeptiden relativ schnell, je länger die Peptidkette aber wird, desto langsamer wird der Potentialendwert erreicht und desto weniger stabil sind die Potentiale. Der Titrationsendwert nach vollständiger Oxydation der Mercaptanpeptide zu den Peptiddisulfiden zeigt sich durch einen großen Potentialsprung in das Gebiet des Elektrodenprozesses

$$2\ J^- = J_2 + 2\ e$$

an.

Es kann vorkommen, daß der Verbrauch an n/5o J_2-Lösung nicht ganz der theoretischen Menge von 1o ml entspricht. Das ist darauf zurückzuführen, daß schon vor Beginn der Titration ein Teil des Mercaptanpeptides durch noch anwesenden Sauerstoff, der vor allem in den Lösungsmitteln hartnäckig gelöst bleibt und schwer zu vertreiben ist, zum Peptiddisulfid oxydiert wurde. Es fand in den Kurven insofern Berücksichtigung, daß die Titration dann nicht bei o ml, sondern entsprechend höher begann.

Nach jeder beendeten Titration wurde das Titriskop über einen eingestellten Fixpunkt wieder in den Eichzustand der Glaselektrode gebracht. Der p_H-Wert wurde nachgeprüft. Das Lösungsmittelgemisch pufferte so gut, daß der p_H-Wert nahezu konstant blieb. Die Abweichungen überschritten nicht o,2 p_H-Einheiten ins saure Gebiet, meist waren sie wesentlich geringer. Sie sind im nächsten Abschnitt als Δp_H aufgeführt.

Das Potential der Verbindung XIX (6-(Cys-tyr-gly-gly-tyr-cys-gly-gly-NH)-farbst.), welche durch Detritylierung aus der entsprechenden S.S'.N-Tritritylverbindung (XVIII) entstanden ist, wurde sowohl im Dunkeln als auch unter Lichteinstrahlung gemessen. Als Lichtquelle wurden

drei 25o W Nitraphot-RS-Lampen verwendet, die in einem Abstand von 2o cm um das Meßgefäß angeordnet waren. Da die Temperatur durch die drei Lampen sehr stark anstieg, mußte ein Ventilator für Luftkühlung sorgen. Zwischen Lichtquellen und Meßgefäß befanden sich Grünlichgelbfilter (Typ GG 1o, Schott und Genossen, Mainz; Dicke 3 mm), die das gesamte UV-Licht und das energiereiche sichtbare Licht bis nahezu 45o nm abschirmen. Das Transmissionsmaximum der Filter liegt bei 57o nm, das Absorptionsmaximum der Farbstoffkomponente bei 574 nm, wodurch eine Verwendung der Filter ermöglicht wird.

Um zu beweisen, daß eine Veränderung des Potentials bei Lichteinstrahlung allein auf der Absorption der Farbstoffkomponente beruht, wurden unter den gleichen Bedingungen die Potentiale sowohl von Cystein als auch von dem aus XII (S.N-Ditr-cys-tyr-gly-gly-tyr-S-tr-cys-gly-OC_2H_5) durch Detritylierung hergestelltem Mercaptanpeptid Cys-tyr-gly-gly-tyr-cys-gly-OC_2H_5 im Dunkeln und unter Lichteinwirkung bestimmt. Ein Potentialunterschied, der außerhalb der Fehlergrenze lag, konnte in beiden Fällen nicht festgestellt werden (siehe den folgenden Abschnitt).

γ. Meßergebnisse

In den folgenden Kurven ist das Potential °E (also das Potential gegen die Normalwasserstoffelektrode) gegen den Grad x der Oxydation des Mercaptans beziehungsweise des Mercaptanpeptides aufgetragen, wobei x von o nach 1 geht. Dadurch ist gleichzeitig durch die Größe

(1-x)m die Konzentration des Mercaptids beziehungsweise des Mercaptanpeptids festgelegt. Den Grad der Oxydation gibt die Menge zugesetzter J_2-Lösung an (x = o : o ml J_2- Lösung, x = 1 : 1o ml J_2-Lösung). Voraussetzung dafür ist natürlich, daß praktisch stets das gesamte Jod, welches portionsweise zugegeben wird, zur Oxydation des Mercaptans beiträgt. Diese Voraussetzung trifft zweifellos zu, da das Jod-Jodid-Redox-Potential viel positiver als die Mercaptan-Disulfid-Redox-Potentiale liegt (siehe Seite 27).

Die mit der kombinierten Platinelektrode gemessenen Potentiale sind auf die Silber-Silberchloridelektrode bezogen. Das Einzelpotential dieser bei 2o°C gesättigten Bezugselektrode beträgt für 25°C +o,2o4 V. Um die mit der Silber-Silberchlorid-Bezugselektrode gemessenen Potentiale ^{Ag}E auf das Potential der Normalwasserstoffelektrode °E zu beziehen, muß der Summand +o,2o4 V nach der Gleichung

$$°E = {}^{Ag}E + o{,}2o4\ V$$

addiert werden.

Die angegebenen Δp_H-Werte bedeuten die am Ende der Messung festgestellten Abweichungen des p_H vom eingestellten Ausgangswert 5 beziehungsweise 6. Sie sind stets negativ, da infolge der Reaktionsgleichung

$$2\ R\text{-}S\text{-}H + J_2 = R\text{-}S\text{-}S\text{-}R + 2\ H^+ + 2\ J^-$$

Protonen entstehen und der p_H-Wert kleiner werden muß.

Abbildung 2 zeigt die Potentiale von Thiophenol, n-Butylmercaptan, Cystein und einigen zum Teil neu dargestellten Cysteinpeptiden bei p_H 5, Abbildung 3 die derselben Verbindungen bei p_H 6; Abbildung 4 zeigt die Potentiale von Cystein, des neu dargestellten Heptapeptidesters und Octapeptidfarbstoffes (XIX) im Dunkeln und bei Belichtung gemessen bei p_H 5 und Abbildung 5 analog bei p_H 6.

Die Meßpunkte, die der besseren Uebersicht halber in die Kurvenbilder nicht eingezeichnet wurden, sind in einem Anhang am Ende der Arbeit (Seite 6o ff) tabellarisch zusammengefaßt worden.

Zu Abbildung 2: $p_H = 5$ $t = 25°C$

1 = Thiophenol, $\triangle p_H = -0,05$

2 = n-Butylmercaptan, $\triangle p_H = -0,05$

3 = Cystein, $\triangle p_H = -0,05$

4 = Cystein, aus S.N-Ditr-cys-OH·$NH(C_2H_5)_2$ (I) dargestellt, $\triangle p_H = -0,14$

5 = Cys-tyr-OC_2H_5, aus S.N-Ditr-cys-tyr-OC_2H_5 (II) dargestellt, $\triangle p_H = 0,00$

6 = Cys-tyr-OCH_3, aus S.N-Ditr-cys-tyr-OH (III) dargestellt, $\triangle p_H = -0,12$

7 = Cys-tyr-gly-gly-tyr-OC_2H_5, aus S.N-Ditr-cys-tyr-gly-gly-tyr-OC_2H_5 (IX) dargestellt, $\triangle p_H = -0,13$

8 = Cys-tyr-gly-gly-tyr-OCH_3, aus S.N-Ditr-cys-tyr-gly-gly-tyr-OH (X) dargestellt, $\triangle p_H = -0,11$

9 = Cys-tyr-gly-gly-tyr-cys-gly-OC_2H_5, aus S.N-Ditr-cys-tyr-gly-gly-tyr-S-tr-cys-gly-OC_2H_5 (XII) dargestellt, $\triangle p_H = -0,15$

10 = Cys-tyr-gly-gly-tyr-cys-gly-OCH_3 (XIV), aus S.N-Ditr-cys-tyr-gly-gly-tyr-S-tr-cys-gly-OH (XIII) dargestellt, $\triangle p_H = -0,15$

11 = 6-(Cys-tyr-gly-gly-tyr-cys-gly-gly-NH)-farbst (XIX), aus 6-(S.N-Ditr-cys-tyr-gly-gly-tyr-S-tr-cys-gly-gly-NH)-farbst (XVIII) dargestellt, $\triangle p_H = -0,09$

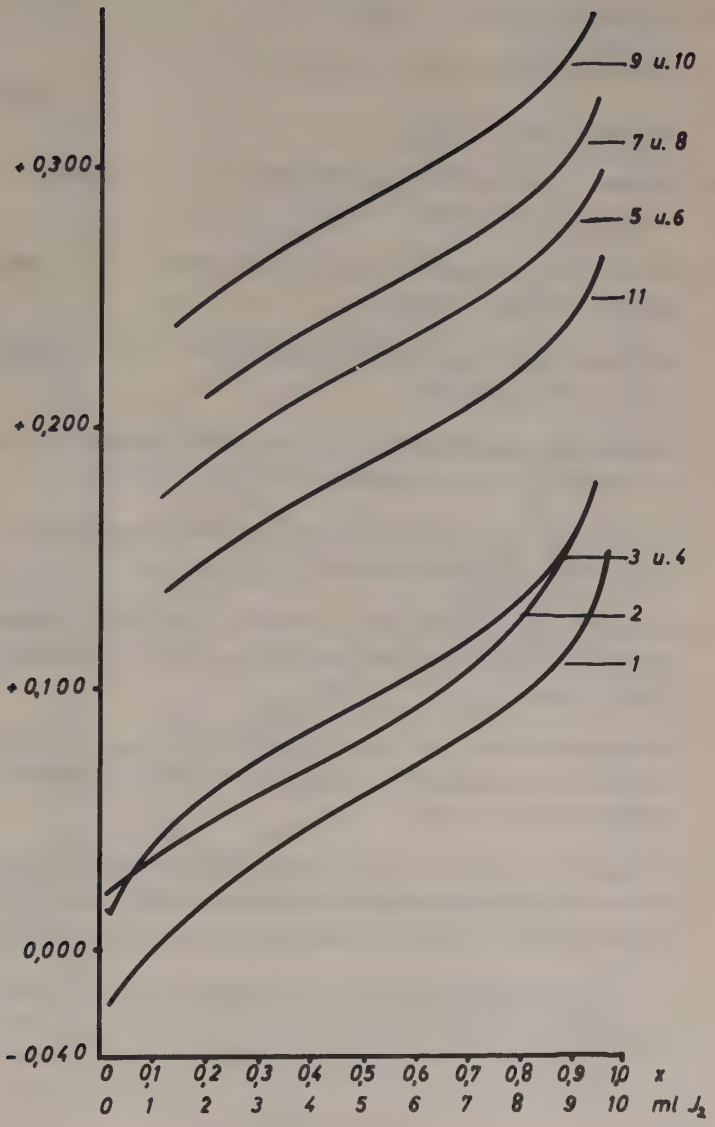

9 u.10
7 u. 8
5 u.6
11
3 u. 4
2
1
+ 0,300
+ 0,200
+ 0,100
0,000
- 0,040
0 0,1 0,2 0,3 0,4 0,5 0,6 0,7 0,8 0,9 1,0 x
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ml J_2

Abbildung 2

Zu Abbildung 3: $p_H = 6$ $t = 25°C$

1 = Thiophenol, $\triangle p_H = -0,16$

2 = n-Butylmercaptan, $\triangle p_H = -0,08$

3 = Cystein, $\triangle p_H = -0,06$

4 = Cystein, aus S.N-Ditr-cys-OH·$NH(C_2H_5)_2$ (I) dargestellt, $\triangle p_H = -0,09$

5 = Cys-tyr-OC_2H_5, aus S.N-Ditr-cys-tyr-OC_2H_5 (II) dargestellt, $\triangle p_H = -0,05$

6 = Cys-tyr-OCH_3, aus S.N-Ditr-cys-tyr-OH (III) dargestellt, $\triangle p_H = -0,02$

7 = Cys-tyr-gly-gly-tyr-OC_2H_5, aus S.N-Ditr-cys-tyr-gly-gly-tyr-OC_2H_5 (IX) dargestellt, $\triangle p_H = -0,05$

8 = Cys-tyr-gly-gly-tyr-OCH_3, aus S.N-Ditr-cys-tyr-gly-gly-tyr-OH (X) dargestellt, $\triangle p_H = -0,08$

9 = Cys-tyr-gly-gly-tyr-cys-gly-OC_2H_5, aus S.N-Ditr-cys-tyr-gly-gly-tyr-S-tr-cys-gly-OC_2H_5 (XII) dargestellt, $\triangle p_H = -0,06$

10 = Cys-tyr-gly-gly-tyr-cys-gly-OCH_3 (XIV), aus S.N-Ditr-cys-tyr-gly-gly-tyr-S-tr-cys-gly-OH (XIII) dargestellt, $\triangle p_H = -0,04$

11 = 6-(Cys-tyr-gly-gly-tyr-cys-gly-gly-NH)-farbst (XIX), aus 6-(S.N-Ditr-cys-tyr-gly-gly-tyr-S-tr-cys-gly-gly-NH)-farbst (XVIII) dargestellt, $\triangle p_H = -0,05$

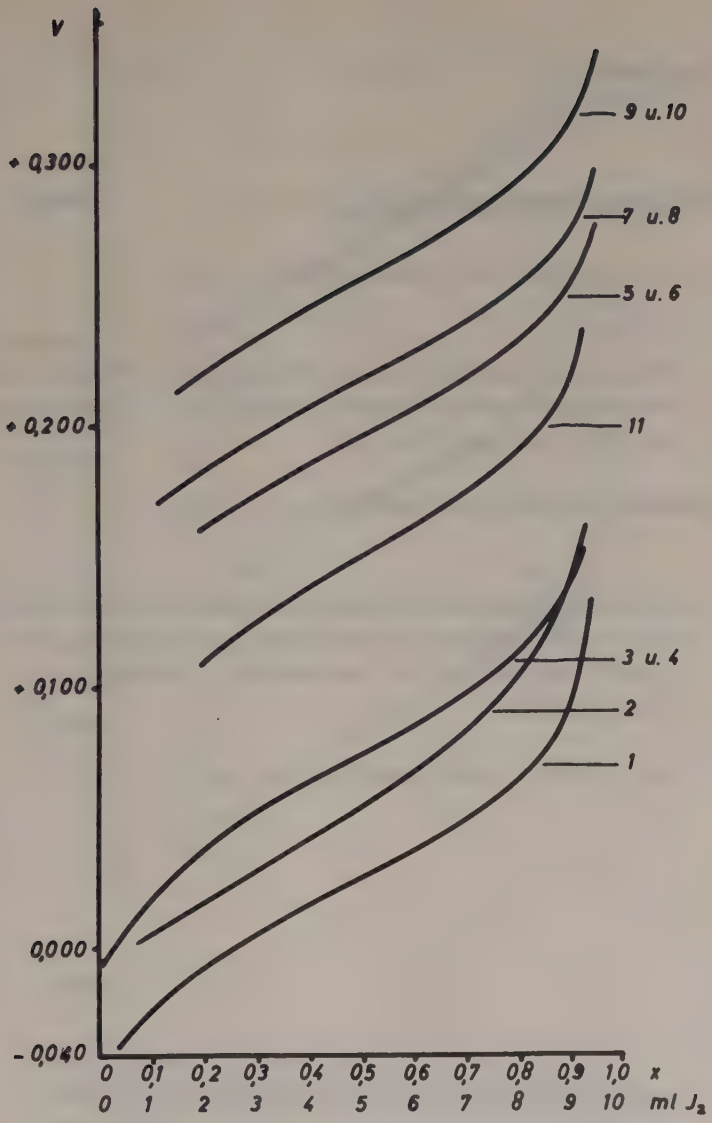

V
0,300
0,200
0,100
0,000
-0,040
9 u.10
7 u.8
5 u.6
11
3 u.4
2
1
0 0,1 0,2 0,3 0,4 0,5 0,6 0,7 0,8 0,9 1,0 x
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ml J2

Abbildung 3

Zu Abbildung 4: $p_H = 5$ $t = 25°C$

1 = Cystein, im Dunkeln, $\triangle p_H = -0,05$

1a = wie 1, unter Belichtung, $\triangle p_H = -0,04$

2 = Cys-tyr-gly-gly-tyr-cys-gly-OC_2H_5, aus S.N-Ditr-cys-tyr-gly-gly-tyr-S-tr-cys-gly-OC_2H_5 (XII) dargestellt, im Dunkeln, $\triangle p_H = -0,02$

2a = wie 2, unter Belichtung, $\triangle p_H = -0,03$

3 = 6-(Cys-tyr-gly-gly-tyr-cys-gly-gly-NH)-farbst (XIX), aus 6-(S.N-Ditr-cys-tyr-gly-gly-tyr-S-tr-cys-gly-gly-NH)-farbst (XVIII) dargestellt, im Dunkeln, $\triangle p_H = -0,10$

3a = wie 3, unter Belichtung, $\triangle p_H = -0,14$

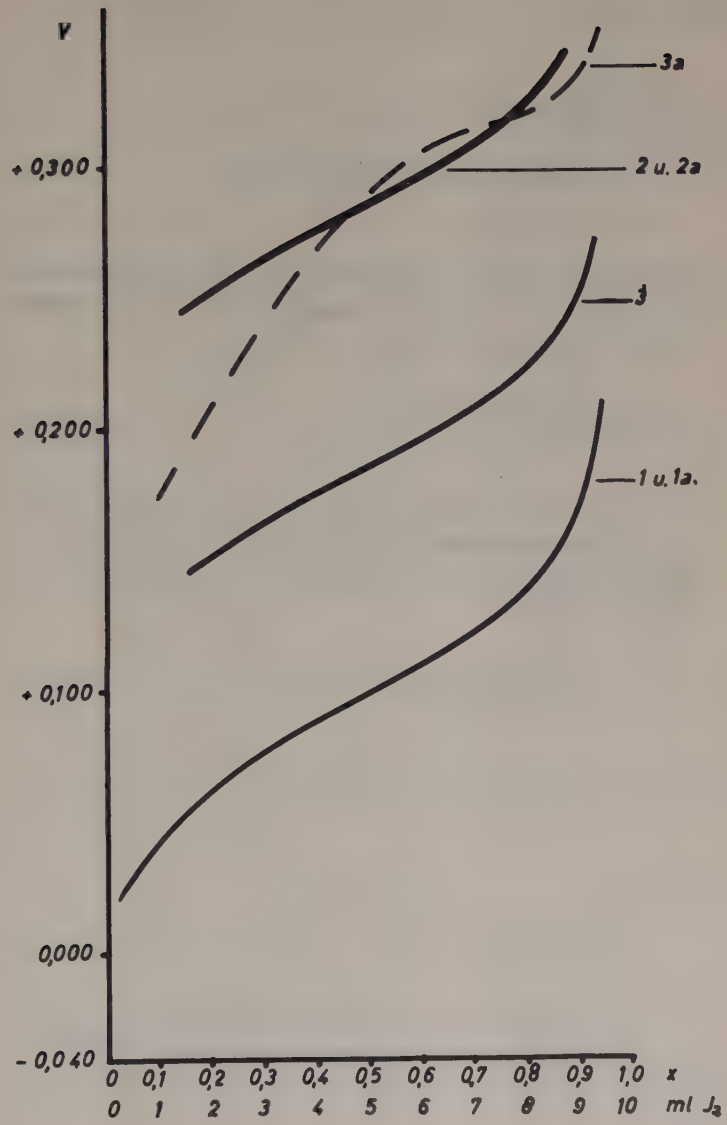

V
+ 0,300
+ 0,200
+ 0,100
0,000
- 0,040
3a
2 u. 2a
3
1 u. 1a.
0 0,1 0,2 0,3 0,4 0,5 0,6 0,7 0,8 0,9 1,0 x
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ml J_2

Abbildung 4

Zu Abbildung 5: $p_H = 6$ $t = 25°C$

1 = Cystein, im Dunkeln, $\triangle p_H = -0,06$

1a = wie 1, unter Belichtung, $\triangle p_H = -0,02$

2 = Cys-tyr-gly-gly-tyr-cys-gly-OC_2H_5, aus S.N-Ditr-cys-tyr-gly-gly-tyr-S-tr-cys-gly-gly-OC_2H_5 (XII) dargestellt, im Dunkeln, $\triangle p_H = -0,07$

2a = wie 2, unter Belichtung, $\triangle p_H = -0,03$

3 = 6-(Cys-tyr-gly-gly-tyr-cys-gly-gly-NH)-farbst (XIX), aus 6-(S.N-Ditr-cys-tyr-gly-gly-tyr-S-tr-cys-gly-gly-NH)-farbst (XVIII) dargestellt, im Dunkeln, $\triangle p_H = -0,09$

3a = wie 3, unter Belichtung, $\triangle p_H = -0,06$

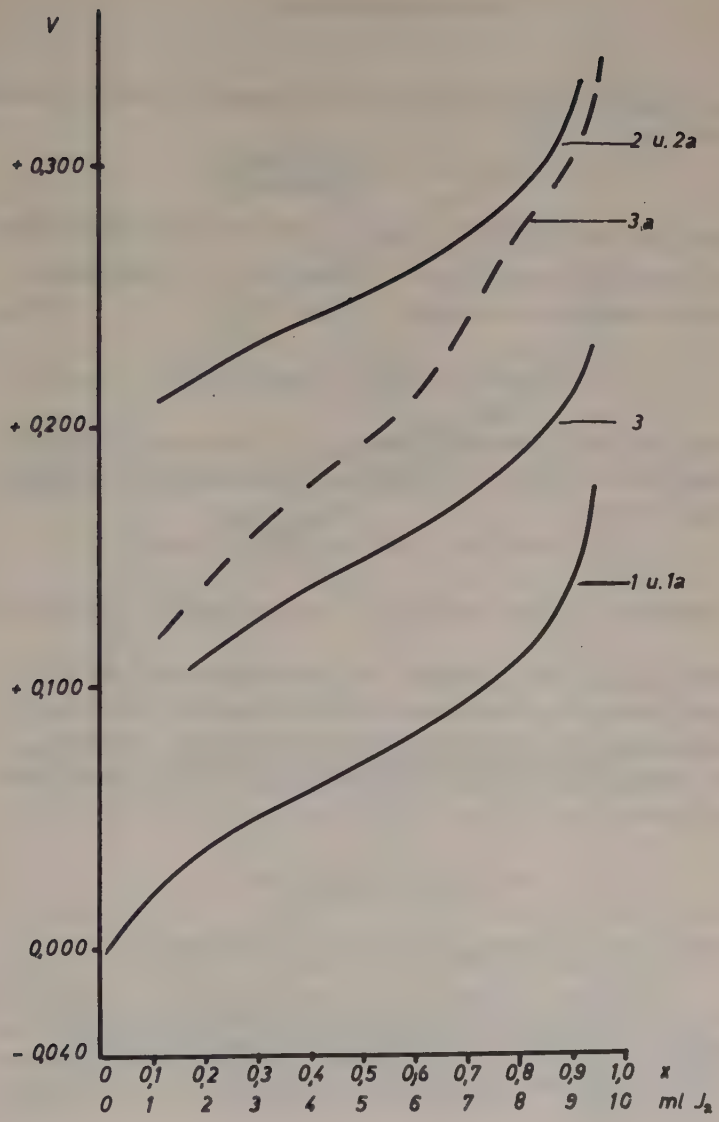

V
+ 0,300
+ 0,200
+ 0,100
0,000
- 0,040
2 u. 2a
3a
3
1 u. 1a
0 0,1 0,2 0,3 0,4 0,5 0,6 0,7 0,8 0,9 1,0 x
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ml J_2

Abbildung 5

D. Diskussion

Die Peters'sche Gleichung für konstanten p_H lautet (siehe Seite 24):

$$°E = \underline{°E} - 0{,}059 \lg \frac{[R\text{-}S\text{-}H]}{\sqrt{[R\text{-}S\text{-}S\text{-}R]}}$$

Setzt man für $[R\text{-}S\text{-}H] = (1-x)m$ und für $[R\text{-}S\text{-}S\text{-}R] = \frac{x}{2} m$ +) und fasst die Glieder mit x, mit m und die konstanten Glieder zusammen, so ergibt sich:

$$°E = \underline{°E} - 0{,}059 \lg \frac{(1-x)}{\sqrt{x}} - 0{,}0295 \lg m - 0{,}009$$

Unter der Voraussetzung, daß m = 1 (in einer beliebigen Einheit) ist, fällt der dritte Summand weg, und die Gleichung lautet:

$$°E = \underline{°E} - 0{,}059 \lg \frac{(1-x)}{\sqrt{x}} - 0{,}009 \quad (1)$$

Gleichung (1) wird von Kurve 1 in Abbildung 6 dargestellt.

Andererseits wurde gesagt, daß das Potential von Sulfhydryl-Disulfid-Gemischen von der Disulfidkonzentration unabhängig sei (siehe Seite 25). Nimmt man R-S-S-R als konstant an und bezieht es in $\underline{°E}$ ein und setzt ebenfalls wie oben m = 1, so folgt:

$$°E = \underline{°E} - 0{,}059 \lg(1-x) \quad (2)$$

Kurve 2 in Abbildung 6 folgt der Gleichung (2).

Die Kurve 3 der Abbildung 6 stellt zum Vergleich das Potential °E von Cystein gegen den Grad der Oxydation x aufgetragen dar. Sie ist identisch mit Kurve 3 der Abbildung 2.

+) m = Anfangskonzentration, siehe Seite 34

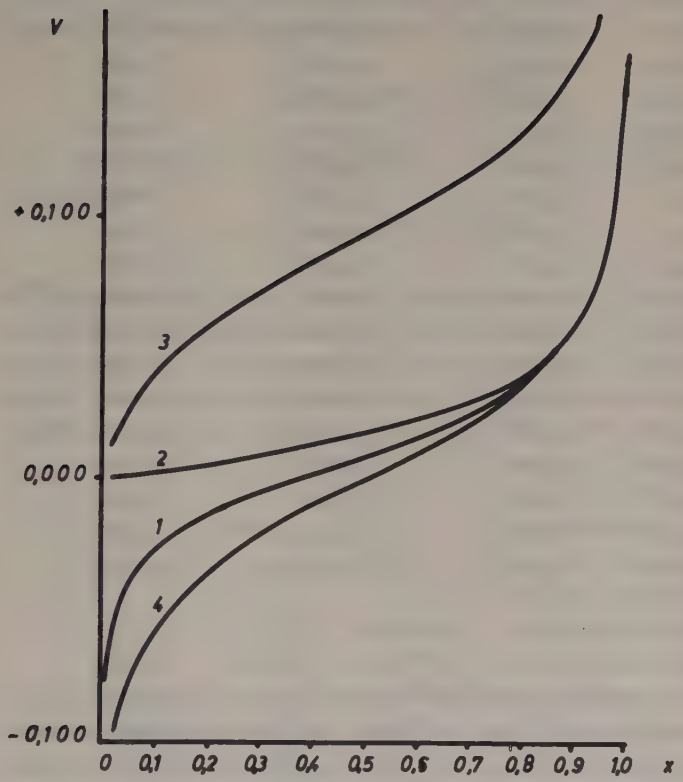


Abbildung 6

Eine Ueberprüfung des Kurvenverlaufs von Cystein mit Gleichung (1) beziehungsweise (2) zeigt Tabelle 1. Darin sind jeweils die Werte °E aus vorgelegtem x und gemessenem °E berechnet worden. Wenn die Cystein-Potentialkurve einer der beiden Gleichungen (1) oder (2) fol-

x	°E aus (1)	°E aus (2)	°E aus (3) (V)
0,02	0,067	0,007	0,108
0,04	0,067	0,016	0,100
0,06	0,069	0,024	0,098
0,08	0,071	0,030	0,095
0,1	0,074	0,035	0,094
0,2	0,085	0,055	0,096
0,3	0,093	0,069	0,100
0,4	0,098	0,077	0,100
0,5	0,099	0,081	0,099
0,6	0,101	0,086	0,099
0,7	0,104	0,090	0,099
0,8	0,106	0,094	0,100
0,9	0,108	0,098	0,101
0,92	0,108	0,099	0,100
0,94	0,109	0,100	0,100
0,96	0,121	0,112	0,112
0,98	0,149	0,140	0,140

Tabelle 1

gen sollte, so müßte in jedem Falle °E unabhängig von x, also konstant sein. Da eine Konstanz, selbst über kleine Bereiche, nicht gegeben ist, folgt der Potentialverlauf bei der Oxydation von Cystein weder Gleichung (1) noch Gleichung (2).

Betrachtet man den Vorgang aber als einen einwertigen Elektrodenprozess der Form

$$R\text{-}S\text{-}H + 1/2\ J_2 = (S) + H^+ + J^-$$

wobei (S) das reversible Zwischenprodukt der Oxyda-

tion sei, welches in das Disulfid R-S-S-R übergeht, so nimmt die Peters'sche Gleichung die Form

$$°E = \underline{°E} - o,o59 \lg \frac{[R\text{-}S\text{-}H]}{[(S)]}$$

an. Nach Einsetzen von $[R\text{-}S\text{-}H] = (1-x)m$ und $[(S)] = x \cdot m$ ergibt sich

$$°E = \underline{°E} - o,o59 \lg \frac{(1-x)}{x} \qquad (3)$$

Kurve 4 in Abbildung 3 zeigt den Verlauf der Funktion (3), der mit der Titrationskurve 3 in guter Uebereinstimmung steht. $\underline{°E}$ aus gemessenem °E nach Gleichung (3) berechnet. zeigt recht gute Konstanz (Tabelle 1). Das Normalpotential $\underline{°E}$ kann also in bezug auf das reversible Zwischenprodukt als Potential $°E_{1/2}$ der Redox-Quote 1/2 postuliert werden. Die $°E_{1/2}$-Werte der einzelnen Verbindungen bringt Tabelle 2. Allerdings haben diese Werte keinen Absolutcharakter, sondern gelten nur unter den gegebenen konstanten Bedingungen, da die in den Werten steckenden Lösungsmittel- und Salzfehler nicht eliminiert werden konnten.

	$_5°E_{1/2}$ (Abb.2)	$_6°E_{1/2}$ (Abb.3)	$\frac{\Delta_E}{\Delta p_H}$
1	o,o63	o,o29	-o,o34
2	o,o8o	o,o56	-o,o24
3	o,o99	o,o76	-o,o23
4	o,1o2	o,o76	-o,o26
5	o,228	o,198	-o,o3o
6	o,223	o,195	-o,o28
7	o,252	o,222	-o,o3o
8	o,247	o,218	-o,o29
9	o,286	o,259	-o,o27
1o	o,288	o,255	-o,o33
11	o,187	o,15o	-o,o37
	(Abb.4)	(Abb.5)	
3a	(o,3o7)	(o,196)	

Tabelle 2

Das Normalpotential scheint von der Peptidkettenlänge abzuhängen, und zwar ist es desto positiver, je länger die Peptidkette wird. In seiner Lage besteht aber kein Unterschied zwischen Methyl- und Aethylester oder einer unveresterten Carboxylgruppe. Wenn das Peptid amidartig mit 6-Amino-1.1'-diäthylisocyaninjodid verbunden ist, fällt das Normalpotential wieder ab.

Eigentümlicherweise ändert sich nicht die Steilheit der Titrationskurven beim Uebergang von den Monomercaptanpeptiden (Kurven 3-8) zu den Dimercaptanpeptiden aus XII (Kurve 9), ferner XIV (Kurve 1o) und XIX (Kurve 11). Da bei der geringen Konzentration der Lösung an Dimercaptanpeptid ein Ringschluß zum cyclischen Disulfid bei der Oxydation anzunehmen ist, sollte man einen zweiwertigen Elektrodenprozeß erwarten, bei dem die Steigung dann nur halb so groß wäre. Diese Diskrepanz wird aber ebenfalls dadurch erklärt, daß das eigentliche reversible Zwischenprodukt ja nicht das Disulfid, sondern das "Semidisulfid" ist, welches selbstverständlich durch einen Einelektronenvorgang gebildet werden kann.

Die p_H-Abhängigkeit $\frac{\Delta E}{\Delta p_H}$ der Potentiale in dem gemessenen Bereich p_H 5 und p_H 6 zeigt Tabelle 2. Der Wert liegt um -o,o29 V, jedoch sind die Dissoziationsverhältnisse der Sulfhydrylgruppen zu unbestimmt, um quantitative Aussagen machen zu können.

Bei der Titrationskurve der Verbindung XIX ((Cys-tyr-gly-gly-tyr-cys-gly-gly-NH)-farbst), unter Bestrahlung aufgenommen, wurde eine deutliche Zunahme der Potentiale gegenüber der unbelichteten Probe sowohl bei p_H 5 als

auch bei p_H 6 festgestellt (Abbildung 4 und 5). Die Potentialkurven weichen auch stark von dem normalen Verhalten ab, die Potentiale selbst sind sehr instabil und unterliegen großen Schwankungen. Die Tatsache, daß die Potentiale wesentlich positiver liegen, ist in der Anregung der Moleküle durch die Lichtenergie begründet.

Aehnliche Verhältnisse tauchen in der schnelleren Reduktion fluoreszierender Farbstoffe durch Mercaptane (49) beziehungsweise von Thionin durch Allylverbindungen (5o) unter Bestrahlung auf. Auch der Photovoltaeffekt, von E. Bequerel 1839 entdeckt und heute viel untersucht (51), geht darauf zurück.

P. Szendrö u. Mitarb. (14) bestrahlten Cystein und fanden die Bildung von Cystin und H_2. J. Weiss u. H. Fishgold (52), die die Versuche an mehreren Mercaptanen wiederholten, diskutierten einen Mechanismus, der eine Spaltung des Mercaptans in Radikale vorsah:

$$R\text{-}S\text{-}H \xrightleftharpoons{h\nu} R\text{-}S^{\cdot} + H^{\cdot}$$

In wässriger Lösung, in der die Mercaptane zum Teil dissoziiert vorliegen, sollte ein Elektronentransfer der Art

$$R\text{-}S^{-} + H\text{-}O\text{-}H \xrightleftharpoons{h\nu} R\text{-}S^{\cdot} + H^{\cdot} + O\text{-}H^{-}$$

stattfinden. Der Elektronenacceptor wäre also Wasser. Dimerisation von 2 R-S· zu R-S-S-R und von 2 H· zu H_2 führte zu Disulfiden und Wasserstoff. Daß sie nicht die Quantenausbeute 1 erhielten, führten sie auf die Rekombination

$$R\text{-}S^{\cdot} + H^{\cdot} = R\text{-}S\text{-}H$$

zurück.

Die Betrachtung der Peters'schen Gleichung beziehungsweise der Gleichung (3) gibt Aufschluß über die Erhöhung der Potentiale. Die Anregung durch die Lichtenergie erhöht die Konzentration des reversiblen Zwischenproduktes (S), sei es dadurch, daß es vorgebildet wird, oder dadurch, daß es (durch Homolyse) direkt entsteht. Durch Vergrößerung des Nenners und Verringerung des Zählers des logarithmischen Gliedes (Gleichung 3) wird der Subtrahend kleiner und der Potentialwert °E größer. Durch die Homolyse des Mercaptans wäre die Redox-Reaktion an sich noch nicht betroffen, da das elementare Jod als Elektronenacceptor fungiert und zum Jodid reduziert wird, während das Wasserstoffradikal zum Proton oxydiert wird.

Da die beiden Kurven 3a (XIX unter Belichtung, Abbildung 4 und 5) nahezu den gleichen Ausgangspunkt haben wie die Kurven 3 (unbelichtet), bei einer Homolyse des Mercaptans aber schon vor Beginn der Oxydation das Zwischenprodukt gebildet oder vorgebildet werden und somit das Potential von Anfang an stark angestiegen sein müßte, wird die Homolyse wahrscheinlich überwiegend erst im Verlaufe der Titration am gebildeten Disulfid einsetzen. Diese Betrachtungsweise reiht sich gut in Untersuchungen über die Bildung von Sulfenylen aus Disulfiden durch Bestrahlung (14, 16) ein.

E. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird durch Carbodiimidkupplung der Zwischenstufen S.N-Dityrityl-L-cysteinyl-L-tyrosin, Glycylglycyl-L-tyrosinäthylester, S-Trityl-L-cysteinylglycinäthylester und 6-Glycylamido-1.1'-diäthylisocyaninjodid, anschließende Detritylierung und oxydative Cyclisierung das cyclische Disulfid des 6-(L-Cysteinyl-L-tyrosylglycylglycyl-L-tyrosyl-L-cysteinylglycylglycylamido)-1.1'-diäthylisocyaninjodid hergestellt. An den Zwischenstufen und zu Vergleichszwecken auch an L-Cystein, Thiophenol und n-Butylmercaptan werden die Redox-Potentiale unter konstanten Bedingungen durch potentiometrische Titration mit Jod bei p_H 5 und p_H 6 gemessen und verglichen. Die Titrationskurven folgen der Peters'schen Gleichung für einwertige Elektrodenprozesse, wobei reversible Zwischenprodukte bei der Oxydation anzunehmen sind, die irreversibel in die Disulfide übergehen.

Eine Abhängigkeit der Potentiale von der Peptidkettenlänge wird festgestellt.

Das zwei Cysteingruppen enthaltende Octapeptid, welches peptidartig mit 6-Amino-1.1'-diäthylisocyaninjodid als lichtabsorbierende Komponente verbunden ist, wird unter denselben Bedingungen im Dunkeln und unter Bestrahlung vermessen. Infolge Anregung des Farbstoffmoleküls durch Lichtenergie steigt die Konzentration des reversiblen Zwischenproduktes bei Belichtung, wodurch die Potentiale weiter in das positive Gebiet verschoben werden.

F. Präparative Vorschriften

1. S.N-Dityityl-L-cystein (Diäthylaminsalz) (I) (24)

Ansatz: 25 g Cystein, 12o g Tritylchlorid, 8o ml Diäthylamin

Ausbeute: 76 g (7o % d.Th.)

F.: 2o4°C

$[\alpha]_D^{2o}$: 71° (c = 2 in Chloroform)

2. S.N-Dityityl-L-cysteinyl-L-tyrosinäthylester (II) (25)

Ansatz: 6,79 g (o,ol Mol) S.N-Ditr-cys-OH·$NH(C_2H_5)_2$ (I), 2,46 g (o,ol Mol) Tyr-OC_2H_5·HCl, Carbodiimidkupplung

Ausbeute: 6,5 g (81 % d.Th.)

Umkristallisieren aus Essigester: Hydrat

F.: 124°C, bei weiterem Erhitzen erneute Kristallisation und Schmelzen bei 179-18o°C

$[\alpha]_D^{2o}$: 71° (c = 2 in Dimethylformamid)

$C_{52}H_{48}N_2O_4S \cdot 1,5H_2O$

	C	H	N	S
ber.:	75,71	6,24	3,4o	3,89
gef.:	76,o6	6,49	3,34	3,53

Umkristallisieren aus Alkohol: wasserfrei

F.: 192-193°C

$[\alpha]_D^{2o}$: 78,4° (c = 2 in Dimethylformamid)

$C_{52}H_{48}N_2O_4S$

	C	H	N	S
ber.:	78,36	6,o7	3,51	4,o3
gef.:	78,1o	6,25	3,52	3,88

3. S.N-Dititryl-L-cysteinyl-L-tyrosin (III) (25)

7,97 g (o,o1 Mol) S.N-Ditr-cys-tyr-OC_2H_5 (II) werden mit 12 ml 2o%-iger KOH in Methanol-Wasser (9 : 1) 3 Minuten am Rückfluß gekocht. Nach dem sofortigen Kühlen läßt man noch 1 Std. stehen, verdünnt mit 6o ml Wasser und stellt mit Eisessig p_H 6 ein. Nach 1/2 Std. Stehen saugt man ab, wäscht mit Wasser, trocknet im Exsiccator und kristallisiert aus Alkohol um.

Ausbeute: 3,6 g (47 % d.Th.)
F.: 156°C
$[\alpha]_D^{2o}$: 87,5° (c = 2 in Dimethylformamid)

4. Tritylglycylglycinäthylester (IV) (23)

Ansatz: 19,6 g (o,1 Mol) Gly-gly-OC_2H_5, 5o g Tritylchlorid, 6o ml Triäthylamin
Ausbeute: 3o,2 g (75 % d.Th.)
F.: 162°C

5. Tritylglycylglycin (V) (26)

Ansatz: 4o,2 g (o,1 Mol) Tr-gly-gly-OC_2H_5 (IV)
Ausbeute: 34,4 g (92 % d.Th.)
F.: 168°C

6. Tritylglycylglycincyanmethylester (VI) (27)

Ansatz: 37,4 g (o,1 Mol) Tr-gly-gly-OH (V), 15 g $ClCH_2CN$
Ausbeute: 37,3 g (9o % d.Th.)
F.: 157°C

7. Tritylglycylglycyl-L-tyrosinäthylester (VII) (28)

Ansatz: 41,4 g (o,1 Mol) Tr-gly-gly-OCH_2CN (VI), 31,2 g (o,15 Mol) L-Tyrosinäthylester
Ausbeute: 4o g (71 % d.Th.)
F.: 132-134°C
$[\alpha]_D^{2o}$: 21,5 ° (c = 1,8 in Tetrahydrofuran)

8. Glycylglycyl-L-tyrosinäthylester (VIII) (23, 28)

Ansatz: 56,6 g (o,1 Mol) Tr-gly-gly-tyr-OC_2H_5 (VII)
Ausbeute: 19,4 g (6o % d.Th.)
F.: 168°C
$[\alpha]_D^{2o}$: 42° (c = o,5 in Eisessig)

9. S.N-Ditrityl-L-cysteinyl-L-tyrosylglycylglycyl-L-tyrosinäthylester (IX)

7,69 g (o,ol Mol) S.N-Ditr-cys-tyr-OH (III) und 3,23 g (o,ol Mol) Gly-gly-tyr-OC_2H_5 (VIII) werden in 4o ml Dimethylformamid gelöst und auf o°C abgekühlt. Zu der kalten Lösung werden 2,16 g Dicyclohexylcarbodiimid, in 5 ml Dimethylformamid gelöst, zugegeben und die Lösung über Nacht stehen gelassen. Man saugt vom ausgeschiedenen Dicyclohexylharnstoff ab, wäscht mit Essigester nach und gibt zum Filtrat noch 2oo ml Essigester. Die Lösung wird erst mit viel Wasser, dann mit Zitronensäurelösung, $NaHCO_3$-Lösung und nochmals mit Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum abgezogen. Den Rückstand nimmt man in 3o ml Benzol auf und fällt den Pentapeptidester mit Petroläther.
Ausbeute: 9,7 g (9o % d.Th.)
F.: 155°C nach vorherigem Sintern
$[\alpha]_D^{2o}$: 53° (c = 1 in Dimethylformamid)

$C_{65}H_{63}N_5O_8S \cdot H_2O$		C	H	N	S
	ber.:	71,47	6,oo	6,41	2,94
	gef.:	71,31	6,39	6,o4	2,83

lo. S.N-Dityrityl-L-cysteinyl-L-tyrosylglycylglycyl-L-tyrosin (X)

lo,74 g (o,ol Mol) S.N-Ditr-cys-tyr-gly-gly-tyr-OC_2H_5 (IX) werden in 6o ml Alkohol gelöst. Zu der Lösung gibt man 31 ml 1 n NaOH und läßt über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Dann verdünnt man mit 18o ml Wasser, saugt vom eventuell Ausgefallenem ab und stellt mit Eisessig p_H 6 ein. Die ausgefallene Peptidsäure wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen, nach dem Trocknen im Exsiccator in Benzol aufgenommen und mit Petroläther gefällt.

Ausbeute: 9,4 g (9o % d.Th.)

F.: 165°C nach vorherigem Sintern

$[\alpha]_D^{2o}$: 22° (c = 1 in Dimethylformamid)

$C_{63}H_{59}N_5O_8S \cdot H_2O$		C	H	N	S
	ber.:	71,1o	5,78	6,58	3,o1
	gef.:	71,36	5,96	7,o4	3,13

11. S-Trityl-L-cysteinylglycinäthylesterhydrochlorid (XI) (24)

Ansatz: 16 g roher S.N-Dityrityl-L-cysteinylglycinäthylester

Ausbeute: ca. 85 % d.Th.

F.: 1oo°C

12. S.N-Dityrityl-L-cysteinyl-L-tyrosylglycylglycyl-L-tyrosyl-S-trityl-L-cysteinylglycinäthylester (XII)

1,06 g (2 mMol) S-Tr-cys-gly-$OC_2H_5 \cdot HCl \cdot H_2O$ (XI) werden in 5 ml Dimethylformamid gelöst und auf o°C gekühlt. Dazu gibt man o,3o2 ml (bei 2o°C 2 mMol) S.N-Ditr-cys-tyr-gly-gly-tyr-OH (X), gelöst in 6 ml Dimethylformamid, und o,433 g Dicyclohexylcarbodiimid. Man läßt die Lösung über Nacht stehen, saugt vom ausgeschiedenen Dicyclohexylharnstoff und Triäthylammoniumchlorid ab, wäscht mit Methylenchlorid nach und gibt zum Filtrat 5o ml Methylenchlorid. Die Lösung wäscht man erst mit viel Wasser, dann mit Zitronensäurelösung, $NaHCO_3$-Lösung, nochmals mit Wasser, trocknet mit Na_2SO_4 und zieht im Vakuum bis zur Trockne ab. Der Rückstand wird aus sehr viel Alkohol umkristallisiert.

Ausbeute: 1,3 g (44 % d.Th.)

F.: 173°C

$[\alpha]_D^{2o}$: 31° (c = 1 in Dimethylformamid)

$C_{89}H_{85}N_7O_{10}S_2 \cdot H_2O$

	C	H	N	S
ber.:	71,51	5,87	6,56	4,29
gef.:	71,31	5,95	6,74	4,26

13. S.N-Dityrityl-L-cysteinyl-L-tyrosylglycylglycyl-L-tyrosyl-S-trityl-L-cysteinylglycin (XIII)

1,477 g (1 mMol) S.N-Ditr-cys-tyr-gly-gly-tyr-S-tr-cys-gly-OC_2H_5 (XII) werden in 6 ml Alkohol aufgeschlämmt und mit 3,1 ml 1 n NaOH versetzt. Nachdem sich die Substanz gelöst hat, läßt man 2 Std. bei Raumtemperatur stehen. Nach Verdünnen mit 18 ml Wasser wird mit Eisessig p_H 6 eingestellt und der Niederschlag nach 1 Std. abgesaugt, mit Wasser gewaschen, im Exsiccator getrocknet und aus 5o ml Alkohol umkristallisiert.

Ausbeute: o,8 g (55 % d.Th.)

F.: 183°C unter Zersetzung

$[\alpha]_D^{20}$: 23° (c = 1 in Dimethylformamid)

$C_{87}H_{81}N_7O_{10}S_2 \cdot H_2O$	C	H	N	S
ber.:	71,25	5,7o	6,69	4,37
gef.:	7o,91	5,57	7,26	4,57

14. 6-(Carbobenzoxyglycylamido)-1.1'-diäthylisocyaninjodid (XVI)

o,418 g (2 mMol) Carbobenzoxyglycin werden in lo ml Dimethylformamid gelöst, dann werden in der Lösung o,469 g (1 mMol) 6-Amino-1.1'-diäthylisocyaninjodid (29) aufgeschlämmt und 1 ml Aethoxyacetylen (3o) dazugegeben. Das Gemisch wird in einem Schüttelkolben mit Hilfe eines Vibrators so lange geschüttelt, bis der Farbstoff ganz oder nahezu in Lösung gegangen ist (24 - 36 Std.). Dann wird vom Ungelösten abfiltriert, das Filtrat mit loo ml Methylenchlorid versetzt, erst mit Wasser, dann mit $NaHCO_3$-Lösung und nochmals mit Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und stark eingeengt. Man fällt das Produkt dann mit Petroläther, nimmt es in absolutem Methylenchlorid auf und läßt es über eine kurze Säule mit Al_2O_3 (neutral nach Woelm) laufen. Nach gutem Auswaschen mit Methylenchlorid wird die Lösung wieder eingeengt und das Produkt mit Petroläther gefällt.

Ausbeute: o,5 g (74 % d.Th.)

F.: 132°C

$C_{33}H_{33}JN_4O_3$	C	H	J
ber.:	6o,1o	5,o4	19,23
gef.:	6o,32	5,45	19,27

15. 6-Glycylamido-1.1'-diäthylisocyaninjodid (XVII)

o,676 g (1 mMol) 6-(Cbo-gly-NH)-farbst (XVI) werden in einem kleinen Kolben mit aufgesetztem P_2O_5-Trockenrohr mit 1,5 ml 2 n HBr in absolutem Eisessig übergossen. Durch häufiges Umschütteln und eventuelles Kneten mit einem flachgedrückten Glasstab wird darauf geachtet, daß alles gut durchweicht ist. Nach 45 Minuten fällt man mit absolutem Aether, den man 5 mal erneuert. Das trockene Produkt wird in lo ml jodfreier halbkonzentrierter Jodwasserstoffsäure aufgenommen, vom Ungelösten abfiltriert und mit NH_3 bis p_H 7 neutralisiert. Dabei fällt das Produkt kristallin aus.

Ausbeute: o,27o g (51 % d.Th.)

F.: 196°C

$C_{25}H_{27}JN_4O \cdot 2H_2O$	C	H	J	N
ber.:	53,38	5,56	22,57	9,96
gef.:	53,17	4,87	22,9o	9,46

16. 6-(S.N-Ditrityl-L-cysteinyl-L-tyrosylglycylglycyl-L-tyrosyl-S-trityl-L-cysteinylglycylglycylamido)-1.1'-diäthylisocyaninjodid (XVIII)

1,449 g (1 mMol) S.N-Ditr-cys-tyr-gly-gly-tyr-S-tr-cys-gly-OH (XIII) werden in lo ml Dimethylformamid gelöst und in der Lösung o,526 g (1 mMol) 6-(Gly-NH)-farbst (XVII) aufgeschlämmt. Zu der Aufschlämmung gibt man o,2o8 g Dicyclohexylcarbodiimid und schüttelt die Mischung 24 Std. im Vibrator. Danach filtriert man vom Ungelösten ab, versetzt das Filtrat mit loo ml Methylenchlorid, wäscht mit Wasser, Zitronensäurelösung, $NaHCO_3$-Lösung, nochmals mit Wasser, trocknet mit Na_2SO_4, engt ein und fällt das Pro-

dukt mit Petroläther aus. Nach mehrmaligem Umfällen aus Methylenchlorid - Petroläther ist es analysenrein.

Ausbeute: 0,950 g (48,5 % d.Th.)

F.: 168°C

$C_{112}H_{106}JN_{11}O_{10}S_2$

	N	S
ber.:	7,87	3,27
gef.:	8,08	3,56

G. Anhang

Tabellen 3 - 5

Meßpunkte zu den Kurven der Abbildungen 2 - 5

					•E (V)					
ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1o	11
o,2	-o,o22	o,o25	o,oo8								
o,4	-o,o12	o,o27	o,o18								
o,6	-o,oo8	o,o31	o,o26	o,o32		o,165					
o,8	-o,oo4	o,o31	o,o32	o,o34		o,175					
1	o,oo1	o,o36	o,o38	o,o37	o,17o	o,175	o,198		o,238		o,135
2	o,o22	o,o48	o,o61	o,o58	o,186	o,192	o,21o	o,216	o,256	o,245	o,15o
3	o,o35	o,o59	o,o78	o,o79	o,2o1	o,2o3	o,224	o,227	o,266	o,26o	o,167
4	o,o46	o,o7o	o,o9o	o,o95	o,216	o,214	o,241	o,237	o,276	o,275	o,177
5	o,o63	o,o8o	o,o99	o,1o2	o,228	o,223	o,252	o,247	o,286	o,288	o,187
6	o,o75	o,o91	o,1o9	o,1o8	o,237	o,236	o,26o	o,265	o,297	o,3o1	o,199
7	o,o84	o,1o5	o,121	o,119	o,245	o,249	o,275	o,272	o,3o8	o,3o4	o,21o
8	o,o98	o,129	o,135	o,139	o,261	o,265	o,285	o,28o	o,323	o,32o	o,225
9	o,114	o,16o	o,157	o,16o	o,278	o,286	o,3o1	o,3o5	o,345	o,34o	o,245
9,2	o,12o	o,17o	o,163	o,165	o,287	o,296	o,31o	o,317	o,353	o,348	o,27o
9,4	o,134	o,189	o,171	o,172	o,299	o,3o4	o,32o	o,325	o,364	o,357	o,3o1
9,6	o,148	o,21o	o,194	o,193	o,312	o,32o	o,332	o,331	o,375	o,367	o,33o
9,8	o,27o	o,264	o,24o	o,22o	o,34o	o,35o	o,348	o,361	o,38o	o,376	o,361
1o	o,386	o,378	o,384	o,368	o,374	o,379	o,371	o,392	o,384	o,382	o,384

Tabelle 3 (zu Abbildung 2)

	°E (V)										
ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1o	11
o,2	-o,o41		o,ooo								
o,4	-o,o35		o,oo6								
o,6	-o,o3o	o,oo5	o,o1o								
o,8	-o,o26	o,oo8	o,o17								
1	-o,o21	o,o1o	o,o21				o,172	o,177	o,2oo	o,21o	
2	-o,oo6	o,o2o	o,o38	o,o43	o,16o	o,15o	o,182	o,186	o,22o	o,225	o,11o
3	o,oo6	o,o34	o,o52	o,o57	o,175	o,166	o,198	o,197	o,235	o,235	o,125
4	o,o17	o,o42	o,o64	o,o66	o,186	o,181	o,2o8	o,2o9	o,248	o,245	o,138
5	o,o29	o,o56	o,o76	o,o76	o,198	o,195	o,222	o,218	o,259	o,255	o,15o
6	o,o41	o,o7o	o,o86	o,o89	o,21o	o,211	o,23o	o,234	o,27o	o,264	o,163
7	o,o51	o,o84	o,o99	o,1o5	o,22o	o,219	o,242	o,245	o,28o	o,281	o,176
8	o,o68	o,1o4	o,112	o,11o	o,232	o,23o	o,256	o,26o	o,29o	o,293	o,19o
9	o,o98	o,142	o,143	o,141	o,255	o,256	o,278	o,28o	o,315	o,32o	o,22o
9,2	o,11o	o,153	o,156	o,162	o,262	o,264	o,285	o,289	o,321	o,33o	o,229
9,4	o,14o	o,179	o,163	o,181	o,271	o,278	o,292	o,297	o,33o	o,338	o,242
9,6	o,19o	o,22o	o,182	o,2o3	o,289	o,299	o,3o6	o,311	o,338	o,344	o,28o
9,8	o,31o	o,3o7	o,28o	o,3o9	o,3o5	o,335	o,348	o,362	o,349	o,36o	o,342
1o	o,39o	o,372	o,369	o,38o	o,37o	o,382	o,377	o,382	o,375	o,38o	o,384

Tabelle 4 (zu Abbildung 3)

Zu Abbildung 4 und 5:

Die Meßpunkte der Kurven 1, 1a, 2, 2a, und 3 sind innerhalb der Fehlergrenze mit den Meßpunkten der entsprechenden Kurven der Abbildungen 2 bzw. 3 - Tabellen 3 bzw. 4 - identisch. Die Meßpunkte der Kurven 3a zeigt Tabelle 5.

	°E (V)	
	3a, p_H 5	3a, p_H 6
ml	(Abb.4)	(Abb.5)
1	o,18o	o,115
2	o,2o2	o,136
3	o,243	o,165
4	o,268	o,178
5	o,294	o,199
6	o,3o8	o,21o
7	o,317	o,244
8	o,323	o,275
9	o,339	o,3oo
9,2	o,345	o,3o8
9,4	o,353	o,319
9,6	o,363	o,335
9,8	o,37o	o,352
1o	o,384	o,38o

Tabelle 5

H. Literaturverzeichnis

1. A. HEFFTER, Medizin. Naturwiss. Arch. 1 81 (1908)
2. F.G. HOPKINS, L. ELLIOTT, Proc. Roy. Soc. London 109 50 (1931)
   P.J.G. MANN, Biochemical J. 26 785 (1932)
3. E.J. BIGWOOD, J. THOMAS, C. R. Soc. Biol. 120 69 (1935)
4. F.G. HOPKINS, Biochemical J. 19 987 (1925)
5. W. GRASSMANN, Biochem. Z. 279 131 (1935)
6. T. BERSIN, Ergebn. d. Enzymforschung 4 68 (1935)
7. E. WALDSCHMIDT-LEITZ, A. SCHAEFFNER, J.J. BEK, E. BLUM, H. EIBELER, Z. physiolog. Chem. 188 17 (1930)
   W. GRASSMANN, O. v.SCHOENEBECK, Z. physiolog. Chem. 194 124 (1931)
8. L. HELLERMANN, M.E. PERKINS, W.M. CLARK, Prod. Nat. Acad. Sci. USA 19 855 (1933)
9. K. MEYER, R. THOMPSON, J.W. PALMER, D. KHORAZO, J. biol. Chem. 113 303 (1936)
10. P. TRIPPINAC, C. R. Soc. Biol. 131 24 (1939)
11. E. WALDSCHMIDT-LEITZ, L. WEIL, A. PURR, Z. physiolog. Chem. 215 64 (1933)
12. F.G. HOPKINS, E.J. MORGAN, L. LUTWAKMANN, Biochemical J. 32 1829 (1938)
    H. v.EULER, H. HELLSTROEM, Z. physiolog. Chem. 255 159 (1938)
13. T. BERSIN, Z. physiolog. Chem. 222 177 (1933)
14. P. SCENDROE, U. LAMPERT, F. WREDE Z. physiolog. Chem. 222 16 (1933)

15. B. JACOBSSON, B. HOEGBERG, Brauwelt 371 (1947)
zitiert über Chem. Zentralblatt 287 (1948)

16. M.S. KHARASCH, W. NUDENBERG, T.H. MELTZER, J. org. Chem. 18 1233 (1955)

17. E. SPODE, E. WEBER, Naturw. 4o 481 (1953)

18. K. ERDMANN, Protoplasma 47 384 (1956)
D.B. HOPE, Biochem. J. 68 37P (1958)
W. BRAUN, E.J. KIRNBERGER, G. STILLE, V. WOLF, Strahlentherapie 1o8 262 (1959)

19. I. HAYN, G. LANGHAMMER, H. STAUDE, Photogr. Korresp. 94 83 (1958)

2o. D. GUENTHER, Dissertation, FU Berlin (1958)

21. L. PAULING, Die Natur der chemischen Bindung, Weinheim 8o (1962)

22. W. BROSER, W. LAUTSCH, Z. Naturforsch. 11b 453 (1956)
W. BROSER, W. LAUTSCH, V. GOEDICKE, Z. Naturforsch. 12b 3o3 (1957)
O. WARBURG, Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten, Berlin (1948)

23. L. CERVAS, D.M. THEODOROPOULOS, J. Amer. chem. Soc. 78 1359 (1956)

24. G. AMIARD, R. HEYMES, L. VELLUZ, Bull. Soc. chim. France 698 (1956)

25. L. VELLUZ, G. AMIARD, J. BARTOS, B. GOFFINET, R. HEYMES, Bull. Soc. chim. France 1464 (1956)

26. G. AMIARD, R. HEYMES, L. VELLUZ, Bull. Soc. chim. France 191 (1956)

27. R. SCHWYZER, B. ISELIN, W. RITTEL P. SIEBER, Helv. chim. Acta 39 872 (1956)

28. W. LAUTSCH u. Mitarb., Chimia 13 129 (1959)
E. SCHWARZ, Diplomarbeit, FU Berlin (1961)

29. F.M. HAMER, J. chem. Soc 123 2333 (1923)
F.M. HAMER, J. chem. Soc. 2o6 (1928)
A. KAUFMANN, E. VONDERWAHL, Chem. Ber. 45 1417 (1912)

3o. B. EGLITON, B.R. JONES, B.L. SHAW,
M.C. WHITING, J. chem. Soc. 186o (1954)
J.F. ARENS, Rec. Trav. chim. Pays-Bas 77 753 (1958)

31. J.F. ARENS, Rec. Trav. chim. Pays-Bas 74 769 (1955)

32. D. BEN-ISHAI, A. BERGER, J. org. Chem. 17 1564 (1952)
D. BEN-ISHAI, J. org. Chem. 19 62 (1954)

33. C. KING, C. LUCAS, Biochem. Z. 235 66 (1931)

34. J. MAURIN, R. PARIS, J. chim. phys.
Physico-Chim. 48 C3o (1951)

35. H. KAUTSKY, H. THIEL, Z. anorg.
allg. Chem. 152 342 (1926)

36. P. PFEIFFER, Z. anorg. Chem. 23o 97 (1936)

37. L. MICHAELIS, L. FLEXNER, J. biol. Chem. 79 683 (1928)

38. M. DIXON, J.H. QUASTEL, J. chem. Soc. 123 2943 (1923)

39. D.E. GREEN, Biochem. J. 27 678 (1933)
J.C. GOSH, S.N. RAYSHAUDHURI, S.C.
GANGULI, J. Indian. chem. Soc. 9 43 (1932)

4o. J.W. WILLIAMS, E.M. DRISSEN, J. biol.
Chem. 87 441 (193o)

41. EARL K. FISCHER, J. biol. Chem. 89 753 (193o)

42. E.C. KENDALL, D.F. LOEWEN, Biochem. J. 22 649 (1928)

43. E.S.G. BARRON, L.B. FLEXNER, L. MICHAELIS
J. biol Chem. 81 743 (1929)

44. J.B. CONANT, Chem. Rev. 3 1 (1927)

45. I.M. KOLTHOFF, W. STRICKS, N. TANAKA
J. Amer. chem. Soc. 77 4739 (1955)

46. J.S. FRUTON, T.H. CLARKE, J. biol. Chem 106 667 (1934)

47. H. BORSOOK, E.L. ELLIS, H.M. HUFFMANN, J. biol. Chem. 117 181 (1937)

48. H. v.WARTENBERG, Z. Elektrochem. 36 295 (1930)

49. F. LIEBEN, E. MOLNAR, Biochem. Z. 230 347 (1931)

50. M. PESTEMER, Z. Elektrochem. 58 121 (1954)

51. I. LEVIN, C.E. WHITE, J. chem. Physics 18 417 (1950)

52. J. WEISS, H. FISHGOLD, Nature 87 71 (1936)

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Organische Chemie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Meinem verstorbenem Lehrer, Herrn Prof. Dr. Lautsch, bin ich zu Dank verpflichtet. Herrn Prof. Dr. Broser gilt mein Dank für seine hilfreiche Unterstützung und seine wertvollen Ratschläge. Herrn Dr. Gnichtel danke ich für seine stete Diskussionsbereitschaft.

L e b e n s l a u f

Am 14. Januar 1933 wurde ich als Sohn des Gastwirts Karl Paul Julius und dessen Ehefrau Margarete, geb. Schulze, in Borna geboren. Von 1939 bis 1943 besuchte ich die Grundschule, danach die dortige Oberschule, wo ich am 9. Juni 1951 die Reifeprüfung bestand.

Bevor ich im Herbst 1952 an der Universität Leipzig für das Fach Chemie immatrikuliert wurde, arbeitete ich in der chemischen Industrie und legte das Laborantenexamen ab. Im Mai 1955 wechselte ich zur Freien Universität Berlin, wo ich am 30. Mai 1956 die Diplomvorprüfung mit der Note "gut" ablegte. Die Diplomarbeit führte ich bei Herrn Prof. Dr. Lautsch aus und bestand die Diplomprüfung am 18. Juli 1959 mit der Note "sehr gut".

Nach mehrjähriger Tätigkeit als Hilfsassistent bin ich seit November 1961 als wissenschaftlicher Assistent am Institut für Organische Chemie der Freien Universität Berlin tätig.